

N° D'ORDRE : 317

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Raymonde DURAND-RIVIÈRES

Première thèse. — CONTRIBUTION A LA MORPHOGÉNÈSE DU SPOROPHYTE
DE « PTERIS LONGIFOLIA » L.

Deuxième thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 février 1964 devant la Commission d'examen.

MM. L. EMBERGER	<i>Président.</i>
C. SAUVAGE	} <i>Examineurs.</i>
M. BOURDU	
R. NOZERAN	
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Centre d'Orsay.	

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1964

N° D'ORDRE : 317

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Raymonde DURAND-RIVIÈRES

Première thèse. — CONTRIBUTION A LA MORPHOGÉNÈSE DU SPOROPHYTE
DE « PTERIS LONGIFOLIA » L.

Deuxième thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 21 février 1964 devant la Commission d'examen.

MM. L. EMBERGER	<i>Président.</i>
C. SAUVAGE	} <i>Examineurs.</i>
M. BOURDU	
R. NOZERAN	
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Centre d'Orsay.	

PARIS

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120

1964

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

LISTE DES PROFESSEURS

Doyen.

M. B. CHARLES.

Assesseurs.

MM. R. JOUTY, I. ASSENMACHER.

Doyen honoraire.

M. P. MATHIAS.

Professeurs honoraires.

MM. R. JACQUES, M. CASTERAS, E. CARRIÈRE, E. TURRIÈRE,
J. SOULAS, G. DENIZOT, J. GRANIER.

Professeurs titulaires.

MM. M. MOUSSERON	Chimie.
L. EMBERGER	Botanique.
CH. BOUHET	Physique.
P. MATHIAS	Zoologie et biologie générale.
J. P. ROIG	Physique.
P. CHATELAIN	Minéralogie et cristallographie.
M ^{lles} O. TUZET	Zoologie et biologie générale.
G. CAUQUIL	Chimie.
MM. G. COUCHET	Mécanique supérieure.
J. SALVINIEN	Chimie-physique.
M ^{lle} A. M. VERGNOUX	Physique.
MM. M. BOUX	Mathématiques.
J. AVIAS	Géologie.
P. VIELES	Chimie.
J. RABINOVITCH	Physique (C. S. U.).
E. KAHANE	Chimie biologique.
J. J. MOREAU	Mécanique rationnelle.
B. CHARLES	Mathématiques pures.
J. MOTTE	Botanique.
R. JOUTY	Physique.
R. LEGENDRE	Zoologie.
C. CHALIN	Physique.
I. ASSENMACHER	Physiologie animale.
B. PISTOULET	Physique.
CH. ROUMIEU	Analyse supérieure.
A. POTIER	Chimie minérale.
R. LAFONT	Physique.
R. JACQUIER	Chimie.
J. FALGUEIRETTES	Minéralogie.
M ^{me} J. CHARLES	Mathématiques.

Professeurs sans chaire.

M ^{me} M. DE POUQUES	Botanique (C. S. U.).
M. P. MURAOUR	Géophysique appliquée.
M ^{me} M. LAFON	Mathématiques.
MM. M. MATTAUER	Géologie.
P. CAILLON	Physique.
G. TOURNE	Chimie.
L. EUZET	Zoologie (C. S. U.).
J. RÉMY	Géologie.
M ^{me} G. VERNET	Biologie animale.
MM. H. ANDRILLAT	Astronomie.
P. DEMANGEON	Géologie.
CH. SAUVAGE	Botanique.
A. BONNET	Botanique.
J. ROUZAUD	Chimie.

Maîtres de conférences.

M ^{me} CH. DUBOUL-RAZAVET	Géologie (C. S. U.).
MM. A. SAVELLI	Physique.
H. CHRISTOL	Chimie.
E. GROUBERT	Physique.
M ^{me} H. GUASTALLA	Biologie physico-chimique.
MM. J. P. LAFON	Mathématiques.
A. STEINER	Psychophysiologie.
G. LAMATY	Chimie.
C. DELOUPY	Physique.
L. GRAMBAST	Botanique.
R. GAUFRES	Chimie.
F. PROUST	Géologie.
A. BASSOMPIERRE	Physique.
A. MARTINEAU	Mathématiques.
R. MARTY	Physiologie animale.
M. MAURIN	Chimie.
M. BOURDU	Physiologie végétale.
J. J. SOULIER	Chimie (C. S. U.).
J. PARIS	Biologie animale (C. S. U.).

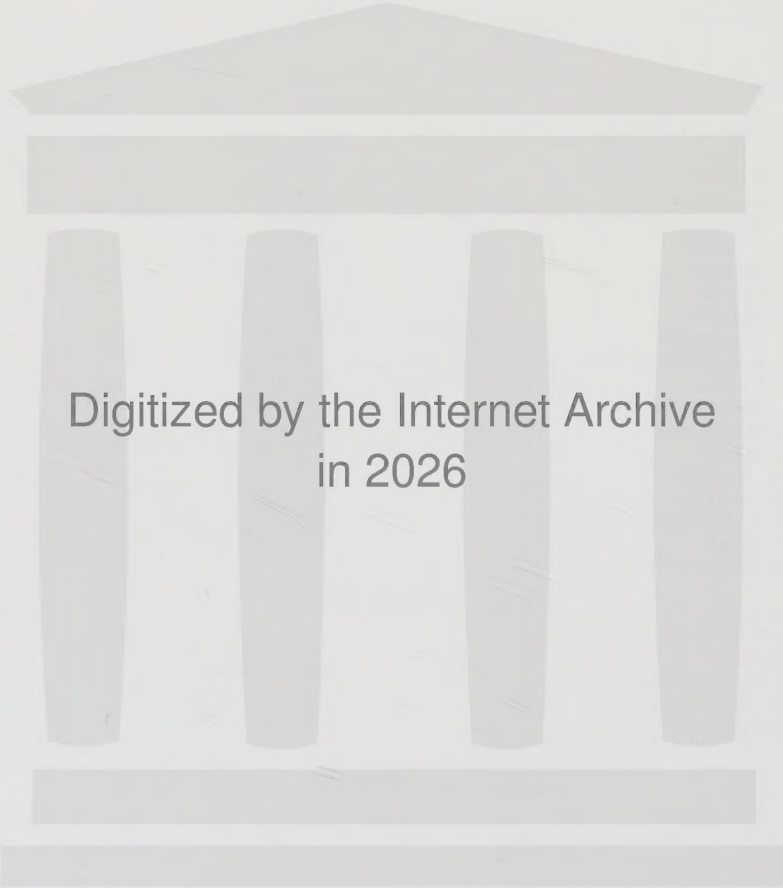
Chargés d'enseignement.

MM. LEFRANC	Mathématiques.
A. STURER	Mathématiques.
M ^{lle} A. BAILLETTE	Mathématiques (C. S. U.).
M. P. MOLINO	Mathématiques (C. S. U.).

Secrétaire principal.

M. E. SIAU.





Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION A LA MORPHOGÉNÈSE DU SPOROPHYTE DE *PTERIS LONGIFOLIA* L.

Par Raymonde DURAND-RIVIÈRES

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
--------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.....	5
HISTORIQUE	7
Embryogénèse, organogénèse, déterminisme embryonnaire.....	8
La morphologie des plantules : la phyllorhize, la « primitive-spindle », la théorie caulinaire.....	11
Morphogénèse expérimentale	12

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — <i>Etude expérimentale de la morphogénèse du sporophyte de Pteris longifolia</i>	20
A. — PLANTULES TÉMOINS	20
B. — CULTURE <i>in vitro</i> DE PLANTULES PORTÉES PAR LE PROTHALLE.....	20
C. — DÉVELOPPEMENT DES SPOROPHYTES ISOLÉS DU PROTHALLE.....	27
1 ^o Milieu liquide entièrement minéral	27
2 ^o Milieu liquide minéral oxygéné	29
3 ^o Milieu minéral solide	30
4 ^o Action des auxines	33
5 ^o Influence des vitamines.....	36
6 ^o Rôle du glucose	40
7 ^o Influence du milieu solide glucosé	46
8 ^o Influence des sucres et des vitamines.....	47
9 ^o Discussion et conclusions : rôle du prothalle dans l'embryogénèse et le développement ultérieur du sporophyte.....	51

CHAPITRE II. — <i>Etudes comparatives des cultures in vitro, des organes de la jeune plantule : la régénération chez le sporophyte</i>	55
A. — OBSERVATIONS AVEC LE POINT VÉGÉTATIF	56
B. — OBSERVATIONS AVEC LA PREMIÈRE FEUILLE.....	56
C. — LE PIED EN CULTURE.....	58
D. — RÉGÉNÉRATION DE LA PREMIÈRE RACINE.....	64
E. — LE PIED ET LA RACINE : LEUR VALEUR MORPHOLOGIQUE.....	70
CHAPITRE III. — <i>Résultats obtenus et conclusions générales</i>	72
A. — FACTEURS DE LA MORPHOGÉNÈSE.....	73
B. — LA RÉGÉNÉRATION CHEZ LES PLANTULES.....	76
BIBLIOGRAPHIE	78

INTRODUCTION

Les recherches dont nous exposons aujourd'hui les résultats, constituent un essai de morphologie expérimentale. Nous avons tenté de déterminer, à l'aide des méthodes de cultures aseptiques, les facteurs qui permettent le développement rapide, à partir du zygote, du sporophyte, de *Pteris longifolia* L.; en même temps, nous avons essayé de comprendre la nature morphologique des divers organes qui composent la très jeune plantule.

Mais avant de décrire nos observations, nous voulons exprimer notre vive gratitude à M. le Professeur EMBERGER, Correspondant de l'Institut. C'est sous sa direction que nous avons effectué les recherches que nous allons exposer. Nous le remercions pour les conseils avisés et bienveillants qu'il nous a prodigués, nous faisant profiter de l'insestimable avantage de sa haute compétence. Nous le remercions plus spécialement, de nous avoir fait confiance et de nous avoir permis d'orienter nos recherches selon des méthodes et dans les directions qui nous intéressaient le plus. Nous n'oublierons pas cette liberté qu'il nous a accordée; qu'il trouve ici le témoignage de notre profond respect et de notre attachement.

C'est avec M. R. NOZERAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, centre d'Orsay, que nous avons préparé un diplôme d'Etudes Supérieures; par la suite, tout au long de notre thèse, il n'a jamais cessé de nous encourager et de nous faire profiter de conseils précieux. Nous le remercions aussi d'avoir bien voulu relire notre manuscrit et nous faire ses critiques.

Nous n'oublierons pas la formation que nous avons reçue de ces deux Maîtres, ni la bienveillante sollicitude qu'ils nous ont toujours manifestée.

Nous tenons aussi à remercier M. R. H. WETMORE, Professeur à l'Université d'Harvard, M. le Professeur A. E. DE MAGGIO, et M. G. MOREL, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique, qui ont bien voulu faire la critique de notre manuscrit, et nous faire profiter de leur expérience et de leur compétence sur la morphogénèse expérimentale des Ptéridophytes.

Nous devons beaucoup à M. le Professeur G. CAMUS, Professeur à la Sorbonne; il nous a donné, à maintes reprises, de nombreux renseignements pour nos recherches, nous le remercions vivement pour ses conseils avisés.

Nous exprimons enfin, notre vive et amicale gratitude à M^{lle} Y. PARÈS, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Dakar; c'est elle, qui nous a initiée aux techniques de cultures aseptiques, et c'est à la suite de ses propres recherches qu'il nous est venu l'idée du présent travail. Nous sommes heureuse de lui témoigner, ici, l'expression de notre amitié reconnaissante.

Nous exprimons aussi notre vive reconnaissance à M. BONNET, Professeur, et à tous nos collègues ou amis de l'Institut Botanique de l'Université de Montpellier, MM. LÜCK, MONNIER, PONS, PRIVAT, ROUX, ainsi qu'à M^{lle} B. GRAILLE. Les nombreuses discussions que nous avons eues avec eux ont contribué à notre formation et nous ont aidée durant l'élaboration de ce travail.

Nous remercions spécialement M. H. LÜCK, Chargé de recherches au C. N. R. S., et M^{lle} B. GRAILLE, Stagiaire, auxquels est revenue la tâche ingrate de relire notre premier manuscrit et de corriger toutes nos références bibliographiques.

Notre gratitude va également à M. le Professeur HARANT qui a mis à notre disposition les Fougères du Jardin des Plantes de Montpellier, ainsi qu'à M. Y. DELANGE, Chef de Cultures.

Nous tenons à remercier tout spécialement M^{me} ROUSSINE pour son aide très précieuse et inlassable au cours des recherches bibliographiques.

Nous remercions enfin M. BERTRAND, Technicien au C. N. R. S., qui a bien voulu assurer la reproduction photographique de nos schémas.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Nous avons utilisé principalement, pour nos expériences, deux espèces de Fougères :

- *Pteris longifolia* L. (Ptéridacée);
- *Acrostichum aureum* L. (Ptéridacée).

Les spores de la première espèce ont été prélevées sur des frondes provenant des serres du Jardin des Plantes de Montpellier. Celles de la deuxième espèce ont été rapportées de la Mangrove de Côte d'Ivoire par MM. ESPAGNAC et R. NOZERAN.

Le développement des prothalles a été obtenu en culture aseptique, selon la méthode mise au point par M^{me} HUREL-PY (1941 à 1955) : les spores sont stérilisées au chlorure de chaux à 5 % pendant 20 minutes; leur suspension est filtrée sur papier-filtre stérile, puis rincée à l'eau stérile; elles sont ensuite ensemencées sur un milieu permettant la formation rapide de prothalles porteurs de sporophytes.

Ce milieu, mis au point par M^{me} PARÈS (1958), a la composition d'une solution de Knop, mais additionnée de 0,5 cm³/litre de solution d'oligo-éléments de Berthelot dont nous indiquons ci-dessous la composition (1) :

H ₂ O	1 000 cm ³
(SH ₄) ₂ Fe ₂	50 g
SO ₄ Mn, 7H ₂ O	2 g
SO ₄ Ca, 2H ₂ O	0,5 g
Cl ₂ Ni, 6H ₂ O	0,05 g
Cl ₂ Co, 6H ₂ O	0,05 g
(SO ₄) ₂ Ti ₂	0,20 g
SO ₄ Zn, 7H ₂ O	0,10 g
SO ₄ Cu, 5H ₂ O	0,10 g
SO ₄ Gl, 4H ₂ O	0,10 g
BO ₃ H ₃	0,05 g
SO ₄ H ₂	1 cm ³

(1) On emploie généralement, aujourd'hui, le liquide de Knop au demi additionné de la solution d'oligo-éléments de HELLER (1953); mais, étant donné que les cultures de sporophytes sur leur prothalle avaient été faites sur liquide de Knop entier et oligo-éléments de Berthelot (PARÈS, 1958), nous avons utilisé, pour nos études comparatives, ce même milieu.

Une telle solution a, comme on le sait, un pH acide, compris entre 5,5 et 6,5. Selon la technique mise au point par Y. PARÈS, les prothalles ont été cultivés sous un éclairage continu de 800 lux environ.

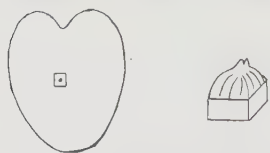


FIG. 1. — Schéma montrant comment se fait l'isolement des embryons. Seul, un cube de gamétophyte, ne comprenant qu'un archégone et son contenu, est isolé.

Nous avons, en outre, cultivé isolément les embryons obtenus sur les prothalles, dans diverses solutions dont nous donnerons la composition au cours de notre exposé. Lorsque nous avons utilisé des plaques de silico-gel, celles-ci ont été préparées selon la méthode mise au point par HELLER (1953). Une fois les embryons ensemencés en milieu sucré, les boîtes de Pétri ont été placées sous un éclairage de 12 heures par jour, éclairage généralement employé pour les cultures de tissus, et maintenues à une température de $21 \pm 2^\circ$.

Pour isoler les embryons, nous avons utilisé des prothalles cultivés aseptiquement à partir de la spore, comme il a été dit plus haut. Sachant par nos observations qu'après un mois de culture la fécondation avait eu lieu,

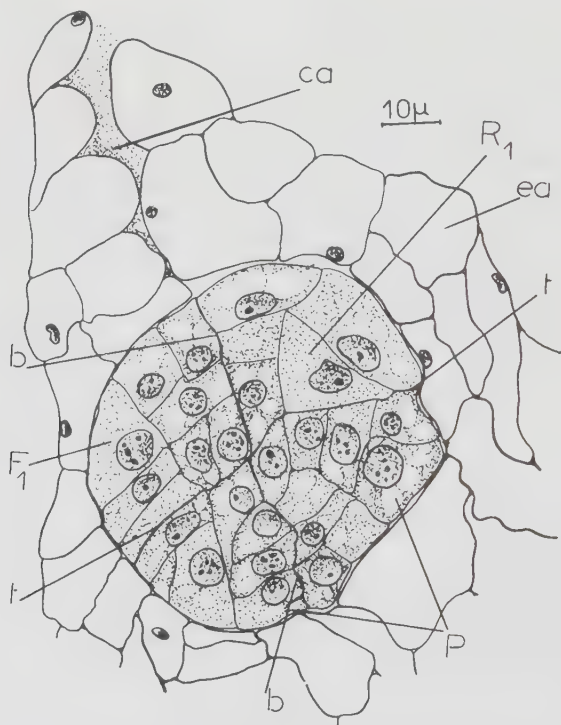


FIG. 2. — *Pteris longifolia*. Coupe à travers un embryon, au moment de son isolement. Celui-ci se fait 25 jours après l'ensemencement des spores. Les initiales de la première racine (R_1) et de la première feuille (F_1) sont déjà individualisées. On reconnaît encore les parois basale (b, b) et transverse (t, t) (P , cellules devant donner le pied suçoir; ca , col archégonial; ea , enveloppe archégoniale).

on place un prothalle arrivé à ce stade dans une boîte de Pétri stérile.

Les archégones contenant de jeunes embryons sont faciles à découvrir grâce à leur forme de protubérance, coiffée d'un col brun. On découpe alors, sous une loupe binoculaire, à l'aide d'aiguilles montées stériles, des morceaux de gamétophytes aussi réduits que possible, pourvus d'un seul archégone embryonné (fig. 1). Pratiquement, ces morceaux ne sont composés que de l'archégone embryonné et de quelques cellules prothalliennes périarchégoniales.

L'expérience acquise aidant, nous avons constaté que les embryons isolés ainsi sont à un stade très jeune, où l'on distingue les premières cloisons et les initiales de la feuille et de la racine (fig. 2). Ce petit cube est ensuite transporté sur le milieu de culture choisi, préalablement stérilisé.

La même technique d'isolement a été employée pour les cultures de racines, de feuilles, et de pieds isolés; mais, pour ces expériences, les prothalles étaient naturellement porteurs d'une très jeune plantule, d'environ 1 cm de long. L'isolement de la feuille, de la racine, du pied ou du point végétatif de la tige s'effectue deux mois après l'ensemencement des spores.

Pour les études histologiques, nous avons fixé notre matériel par contact de douze à vingt-quatre heures avec le micro-formol de Bouin additionné de 5 % d'acide acétique; les colorations ont été faites soit à l'hématoxyline, soit au carmin ferrique.

HISTORIQUE

Les Filicales ont été étudiées depuis fort longtemps. Dès 1788, ERHART note que le développement d'une Fougère est précédé de la formation d'un organe foliacé et bilobé, le prothalle; mais il faut attendre SUMINSKI (1848), pour que soit découvert le développement de l'embryon à l'intérieur des tissus prothalliens. C'est à HOFMEISTER (1851) que revient le mérite de comprendre la véritable valeur de la spore, du prothalle, de l'embryon et de la plante feuillée, ainsi que l'alternance de génération.

Les noms de PRINGSHEIM, KNY, VOUK, LEITGEB, KLEIN, CAMPBELL, etc., sont liés aux travaux sur le développement des Filicales. Aux premières observations, les auteurs ajoutèrent bientôt, soit l'étude de la segmentation du zygote et de l'embryogénèse, soit des études morphologiques et anatomiques des plantules; d'autres encore, à la suite de ces travaux, élaborèrent des théories concernant la nature morphologique des diverses parties du sporophyte; plus récemment enfin, les Fougères ont été un matériel de choix pour les études de morphogénèse.

Embryogénèse, organogénèse, déterminisme embryonnaire.

Les premières recherches détaillées du développement du zygote ont été faites par HOFMEISTER (1851, 1857). Il découvre, chez *Aspidium filix-mas* et *Pteridium aquilinum*, que la première cloison, après la fécondation de l'œuf, comprend l'axe de l'archégone et est perpendiculaire au plan du prothalle (fig. 3; *b,b*) déterminant ainsi, une cellule antérieure du côté du méristème apical (hémisphère épibasal), une postérieure du côté de la spore (hémisphère hypobasal). La

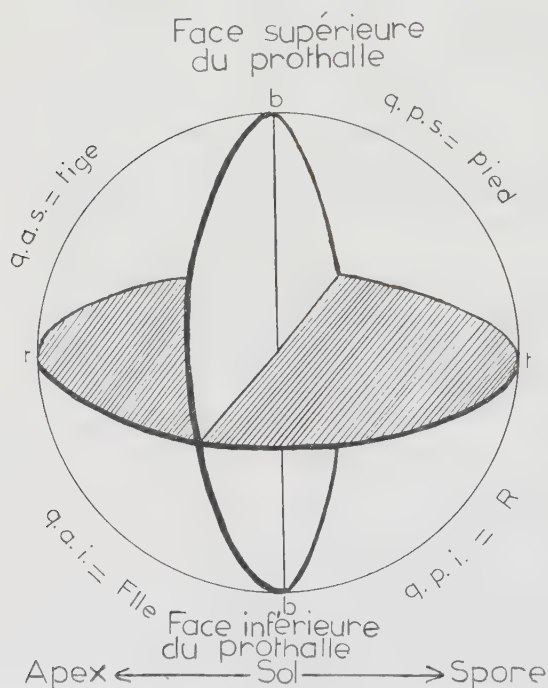


FIG. 3.

Succession des premières cloisons dans l'embryon, selon les premiers auteurs (*q.a.s.*, quadrant antéro-supérieur; *q.p.s.*, quadrant postéro-supérieur; *q.a.i.*, quadrant antéro-inférieur; *q.p.i.*, quadrant postéro-inférieur; *Feuille*, feuille; *R*, racine; *tt*, paroi transverse; *bb*, paroi basale).

deuxième cloison (cloison quadrante), perpendiculaire à la première et située dans le plan du prothalle (fig. 3; *t,t*), partage le zygote en quatre segments de sphère. Pour cet auteur, la première feuille et l'apex de la tige prendraient naissance, chez ces deux espèces, à partir du quadrant antéro-inférieur; mais la cellule initiale de la racine serait opposée à celle de la tige chez *Aspidium*, alors qu'elle serait du même côté chez *Pteridium*.

Quant au pied, il l'interprète comme un axe primaire avorté.

Ultérieurement, PRINGSHEIM chez *Salvinia* (1863), HANSTEIN chez *Marsilea* (1865) et KNY chez *Ceratopteris* (1874) font des observations contradictoires : ils ne sont pas d'accord sur l'origine des organes de la plantule. Pour le premier, l'œuf entier serait la tige, puis celle-ci

séparerait le pied ou la feuille; pour HANSTEIN, l'axe serait l'hémisphère épibasal, tandis que la racine serait tout l'hémisphère hypobasal; quant à KNY, il pense que les deux quadrants antérieurs formeraient la feuille dont la tige et la racine ne seraient que des expansions latérales.

VOUK (1877) essaye de préciser le mode de segmentation; et c'est à lui que nous devons la désignation des parois. Il se forme dans le zygote une première cloison, perpendiculaire au plan du prothalle, la *paroi basale* (fig. 4; *b,b*) le partageant en deux moitiés, l'une antérieure

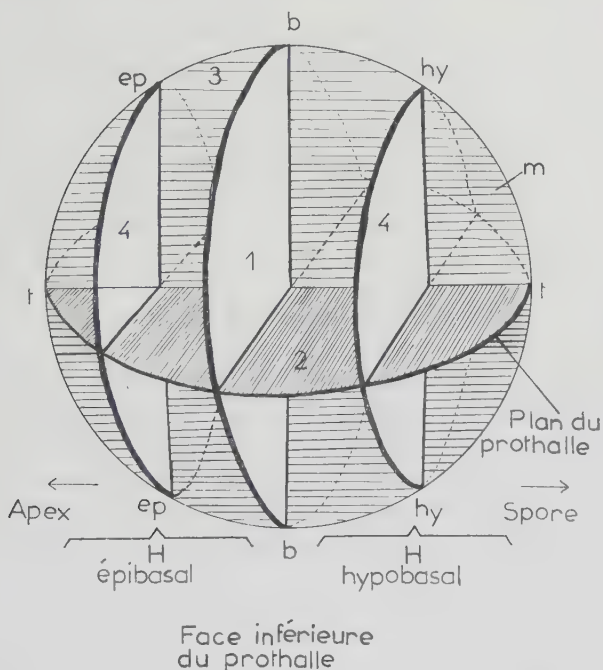


FIG. 4. — Schéma montrant le mode de segmentation de l'embryon selon Vouk (*bb*, paroi basale; *tt*, paroi transverse; *m*, paroi médiane; *ep*, paroi épibasale; *hy*, paroi hypobasale; 1, 2, 3, 4, ordre d'apparition des cloisons; *H*, hémisphères).

ou *épibasale* du côté de l'apex du prothalle, l'autre postérieure ou *hypobasale* du côté de la spore. Apparaissent ensuite la *paroi transverse* (fig. 4; *t,t*) située dans le plan du prothalle, puis la *paroi médiane*, *m,m*, comprenant l'axe de l'archégone et perpendiculaire, elle aussi, au plan du prothalle, mais dans son plan de symétrie. L'ordre d'apparition de ces deux dernières cloisons peut d'ailleurs être inversé. Nous avons atteint le stade « *octant* ». Après ces premières divisions, les mitoses suivantes déterminent deux cloisons parallèles à la paroi basale, situées, l'une dans la région épibasale (fig. 4; *ep*), l'autre dans la région hypobasale, *hy*.

La moitié épibasale est à l'origine de la première feuille et de la

tige, l'hypobasale, du pied et de la racine. Après la séparation des premiers organes de l'embryon, VOUK admet la formation du « carré fondamental » central, constitué de huit cellules, qui donnerait naissance au cylindre central de la tige.

Les recherches postérieures, dues à KIENITZ - GERLOFF (1876), LEITGEB (1878), KLEIN (1884) et CAMPBELL (1918), n'apportent que peu de changements aux résultats de VOUK, devenus désormais classiques.

Nous noterons seulement l'abandon de la notion de « carré fondamental » et l'apparition de celle d'initiales pour chacun des octants. C'est ainsi que l'on retrouve la description suivante de CAMPBELL à propos d'*Onoclea Struthiopteris* : la première cloison, dans toutes les Polypodiacées, est verticale; cette cloison basale divise l'embryon en une moitié épibasale antérieure, et une postérieure hypobasale. La première produit la tige et le cotylédon, la dernière, la première racine et le pied. La deuxième cloison est transversale, séparant la feuille et la tige dans la partie épibasale, le pied et la racine dans l'hypobasale. Les cloisons suivantes, ou cloisons « octant », sont médianes mais ne se correspondent pas exactement dans chaque quadrant.

Des indications identiques se retrouvent chez BOWER (1923).

Il faut, alors, attendre VLADESCO (1933, 1934) pour approfondir la connaissance de l'organogénie des Fougères, en particulier, celle des Leptosporangiées (*Gymnogramme sulphurea*, *Aspidium filix-mas*, *Dryopteris parasitica*, *Scolopendrium vulgare* et *Pellea viridis*). Cet auteur arrive aux conclusions suivantes qui sont en opposition avec les données classiques :

« La deuxième segmentation détermine l'apparition de la paroi médiane et non de la paroi transverse. » Elle partage l'embryon en cellules quadrantes juxtaposées dans le plan du prothalle; chacun de ces quadrants, au lieu de correspondre à la totalité d'un seul organe, représente la moitié de deux organes différents... La segmentation en quadrant n'a donc aucune signification dans le déterminisme embryonnaire; l'orientation et la succession des divisions ne permettent pas d'attribuer aux octants une croissance apicale. Le première feuille tire son origine du développement égal des octants antéro-inférieurs, sans qu'il y ait, à aucun stade, formation d'une initiale typique. La différenciation de l'initiale de la première racine apparaît dans l'un des octants postéro-inférieurs. Le pied ne résulte pas uniquement des deux octants postéro-supérieurs; une partie des deux octants antéro-supérieurs participe à sa constitution. L'initiale du point végétatif de la tige ne résulte pas de la croissance apicale de l'un des octants antéro-supérieurs, mais naît dans l'un de ces octants. La deuxième feuille s'initie indépendamment du point végétatif de la tige, soit dans le même octant, soit dans l'octant voisin. La manière dont se cloisonnent les octants et l'individualisation des organes montrent que les octants primitifs n'ont aucune signification ontogénique.

*La morphologie des plantules :**la phyllorhize, la « primitive-spindle », la théorie caulinaire.*

La structure morphologique de la jeune plantule, plus accessible aux investigations, est depuis longtemps connue. Tous ceux qui se sont intéressés à la segmentation ont aussi décrit le développement du sporophyte. On sait qu'il se forme d'abord par apparition du « cotylédon », de la première racine, puis d'une deuxième feuille ayant à sa base le point végétatif de la tige, d'où feuilles et racines tireront leur origine. Cette plantule est implantée dans le prothalle et reçoit de ce dernier, comme un parasite, les matières nutritives à travers le pied ou suçoir.

Étudiant les rapports existant entre les racines et les feuilles des jeunes sporophytes, VELENOVSKY (1913), CHAUVEAUD (1911, 1921), et VLADESCO (1934) admettent la théorie de la « phyllorhize ». Ils considèrent que la plantule de Fougère est formée par apparition successive d'organes différents, les « phylles » (feuilles) auxquelles correspondent les « rhizes » (racines). Chaque phyllorhize constitue ainsi une unité morphologique fondamentale. La tige ou caule est formée par coalescence de la base des phylles.

BOWER (1923, 1935) combat l'un des premiers cette théorie en se basant sur des considérations embryologiques. Pour lui, l'embryon des Ptéridophytes a une forme de « spindle » dont l'apex correspond à l'apex de la tige et dont la base est le suspenseur. Chez les Leptosporangiées, l'identification du filament primitif est rendue difficile par l'absence du suspenseur et la formation d'organes qu'il considère comme accessoires : la racine et le pied. Il affirme cependant que l'apex du « spindle » est l'apex de la tige et tire son origine de l'hémisphère épibasal : le développement foliaire vient ensuite; la première feuille est latérale par rapport à l'apex, mais naît aussi de l'hémisphère épibasal. La racine, comme nous l'avons déjà dit, est pour lui un organe accessoire, ainsi que le pied qui se développe en position convenable pour sa fonction de succion. Il le considère comme un organe adaptatif.

Les progrès faits en Paléontologie végétale ont permis de mettre fin à la controverse sur la constitution élémentaire des végétaux vasculaires et de confirmer la théorie caulinaire (LIGNIER, 1911; ZIMMERMANN, 1938; EMBERGER, 1944 à 1960).

On pense généralement aujourd'hui qu'il n'existe pas de différence fondamentale entre les trois organes qui composent le corps des végétaux vasculaires : la tige, la racine et la feuille. Si nous considérons, en effet, certains Cryptogames vasculaires fossiles, on peut constater que les organes souterrains jouant le rôle de racine ont la même structure que la tige aérienne (*Asteroxylon*); de même, le rachis de certaines frondes, à structure bilatérale chez les Fougères modernes, est caulinaire, chez certaines formes archaïques. L'observation des

végétaux vasculaires les plus anciens a permis de montrer qu'ils étaient uniquement constitués d'axes. On pense donc, actuellement, que la structure des organes des végétaux actuels dériverait, par modifications successives, de systèmes caulinaires ramifiés. En conséquence, « *l'axe est l'organe fondamental, racine et feuille en sont des modifications différenciées au cours de la phylogénèse et ayant acquis une certaine indépendance morphologique; aucune barrière n'existe plus entre ces trois catégories d'organes* » (EMBERGER, 1952).

Chez les Fougères vivantes, plusieurs auteurs (LACHMANN, 1889; TROLL, 1950; BONNET, 1955; M^{lle} B. GRAILLE, 1961) ont pu confirmer la véracité de cette interprétation. Enfin WARDLAW (1943, 1952, 1955), après une étude détaillée de l'embryogénèse et en se basant sur des investigations expérimentales, a montré que les faits sont en faveur d'une théorie axiale « *the sporophyte may well be considered to be an axial structure... the shoot apex being the primary morphogenetic region of plant* ».

Morphogénèse expérimentale.

Si l'on veut cerner avec précision les facteurs influant sur le déroulement de la morphogénèse du sporophyte, on doit tenir compte des facteurs extérieurs au sporophyte : sa nutrition et celle du prothalle, l'influence de ce dernier sur le zygote, etc., et ceux inhérents au sporophyte lui-même : les facteurs corrélatifs, etc.

Étant donné la multiplicité de ces facteurs, les chercheurs ont dû se cantonner chacun dans un domaine bien défini, si bien que chacun d'eux ne s'est occupé que d'un aspect des problèmes posés.

Embryologie expérimentale. — C'est sur ce point qu'ont porté les premières expériences effectuées sur les Fougères. LEITGE (1878, 1879) et SADEBECK (1879) recherchèrent l'influence de la gravité sur l'apparition des premières cloisons embryonnaires; HEINRICHER (1888) celle de la lumière, et BOWER (1935) rapporte les travaux de LANG (1909, 1915) sur l'effet des pressions exercées sur le jeune embryon par les parois archégoniales et les tissus prothalliens. Plus tard, VLADESCO (1934), utilisant la méthode des cultures aseptiques, montre qu'*in vitro* l'embryogénèse n'est pas modifiée, sauf lorsque les prothalles sont submergés.

Les recherches sur l'embryon n'ont été reprises que très récemment et sont peu nombreuses. Nous citerons celles de WARD (1954), puis celles de WARD et WETMORE (1954).

Après une étude de la fécondation et de l'embryogénèse de *Phlebodium aureum*, ces auteurs ont essayé, à leur tour, de découvrir si les parois archégoniales ont une influence sur l'embryon inclus. Dans ce but, ils coupèrent le col archégonial et écartèrent du jeune embryon les parois latérales de l'archégone, de manière à ce qu'il ne reste en contact avec le prothalle que par l'intermédiaire des cellules de la

partie supérieure du pied. Il en résulta une évolution du jeune embryon, en une masse parenchymateuse sur laquelle prirent naissance deux ou trois bourgeons sporophytiques à feuilles et tige normale, mais sans racine.

A leur tour, JAYASEKERA et BELL (1959) obtinrent le développement d'archégonies auxquels seulement quelques cellules de prothalle étaient restées attachées : ils pensent que l'œuf, dans les conditions normales, est soumis à deux sortes d'influences, celle de l'auxine diffusée à partir du méristème apical du gaméophyte (ALBAUM, 1938), responsable de l'orientation de la première division du zygote, et celles des pressions exercées par les parois archégoniales sur le contenu, qui empêcheraient une croissance anarchique des tissus sporophytiques.

Enfin, DE MAGGIO et WETMORE (1961) ont récemment étudié le développement de l'embryon de *Todea barbara* entièrement extrait de l'archégone. Ils se sont aperçus que la morphogénèse du très jeune sporophyte (zygote) nécessite, outre divers facteurs nutritifs, l'action physique produite par les cellules archégoniales sur leur contenu.

Nutrition des sporophytes. — Ce sont surtout les facteurs nutritifs nécessaires à la croissance de sporophytes adultes qui ont été étudiés. GÖBEL (1908) déjà, montre qu'il y a une relation entre nutrition et forme de feuille. Plus tard, THOMPSON (1915) démontre qu'un apport nutritif insuffisant entraîne une diminution de la taille de la tige et une simplification de la structure stellaire, accompagnée d'un retour à un stade plus archaïque. Récemment, ALLSOPP (1951 à 1956), SCHWABE (1951, 1953) et M^{me} L. SOSSOUNTZOV (1958) se sont attaqués à ces problèmes.

ALLSOPP (1952, 1953) entreprit l'étude du développement de *Marsilea drummondii*, en culture aseptique, à partir du sporocarpe. Il met au point le milieu le plus favorable à ce développement (Knop dilué de moitié, oligo-éléments, 3 % de glucose), puis constate que les plantules, tout comme les prothalles, sont susceptibles de subir des modifications suivant les conditions de culture. Les principaux changements observés sont une régression foliaire souvent accompagnée d'une simplification de l'anatomie du rhizome. Le retour aux feuilles juvéniles est provoqué, soit par la suppression du glucose ou son remplacement par un autre sucre, soit par de fortes concentrations d'AIA ou d'ANA qui, outre la régression foliaire, inhibent la production de la racine.

Ces diverses expériences lui permettent de conclure que le développement des feuilles de type juvénile ou des feuilles de type définitif est déterminé par la nutrition de l'apex de la tige; un apport nutritif insuffisant entraînant l'apparition de formes juvéniles. Outre ces essais, ALLSOPP cultiva *Marsilea* avec diverses substances de croissance et en particulier le 3-indolyl-acétonitrile. Il constate que cette substance favorise le développement des racines latérales, l'extension des entre-nœuds et le développement des bourgeons latéraux du rhizome.

L. SOSSOUNTZOV (1958), fragmentant des rhizomes de *Marsilea* cultivés sur Knop au demi, oligo-éléments et 3 % de glucose, et les ensemençant sur des milieux carencés en calcium, obtient la formation de nouveaux sporophytes dont le rhizome se ramifie par développement de bourgeons dormants. Avec des concentrations optimales de calcium et de potassium, et une concentration trop forte en magnésium, elle obtint la réduction du système foliaire et radiculaire, avec retour aux feuilles juvéniles. Enfin, employant de fortes concentrations d'indol-acétonitrile, elle observe un retour aux feuilles de forme juvénile et le développement de bourgeons latéraux.

SCHWABE (1951, 1953) étudie la nutrition minérale de *Pteridium aquilinum* et, en particulier, les effets du phosphore et du potassium sur la production, la forme et le poids foliaire; il constate que les déficiences en ces deux éléments provoquent une production foliaire réduite, que la longévité des plantes décroît ainsi que leur vitesse d'assimilation, mais il montre qu'une moindre lumière est bénéfique pour les plantes carencées en potassium. Il conclut, d'ailleurs, que les différents facteurs (teneur en phosphore, sodium et ammonium, lumière, etc.) jouent un rôle important, mais qu'aucun n'agit indépendamment les uns des autres et qu'il y a interaction réciproque entre ces facteurs.

Facteurs de la morphogénèse inhérents au sporophyte. — Les expériences tentant de démontrer le rôle des facteurs inhérents au sporophyte ne sont nombreuses que depuis une vingtaine d'années. Auparavant, seul GÖBEL (1905, 1908) avait pu induire un retour aux feuilles juvéniles chez *Ceratopteris*, et montrer qu'il y a une relation entre le degré de régression et l'âge de la plante. Quant à LANG (1915), en détruisant l'apex du rhizome d'*Osmunda*, il obtint parfois la ramification du rhizome et il s'aperçoit que le système vasculaire nouvellement formé entre en connexion avec la trace foliaire sous-jacente.

Plus tard, ALBAUM (1938) étudie la répartition et les effets des hormones prothalliennes sur la croissance du sporophyte. Après diverses mutilations du prothalle (section de sa partie apicale) ou du sporophyte porté par celui-ci (section de la première feuille, application de lanoline pure ou de lanoline contenant de l'acide indol-acétique à la surface de section), il conclut qu'avant le développement complet de la première feuille du sporophyte, la production d'hormones est le fait de la région apicale du prothalle; par contre, après le développement total du « cotylédon », ce dernier devient le nouveau centre producteur d'auxine et inhibe, non seulement la croissance du prothalle et la formation sur ce dernier de prothalles adventifs, mais encore la croissance rapide des feuilles suivantes. ALBAUM donne enfin divers schémas de la répartition des substances de croissance dans le prothalle et le jeune sporophyte (fig. 5).

C'est à WARDLAW (1943 à 1959), WETMORE et ses collaborateurs, CUTTER, STEEVES, SUSSEX et *al.* que nous devons le plus grand nombre de travaux dans cet ordre d'idées. En utilisant diverses méthodes expérimentales (traitements chirurgicaux, analyse chimique, cultures aseptiques, etc.), ils ont essayé de comprendre le fonctionnement du méristème apical du rhizome de plusieurs Fougères et son rôle dans le développement du sporophyte, depuis la formation de la vascularisation de la stèle, des primordiums foliaires, des bourgeons latéraux, jusqu'au déroulement complet de la fronde et la sporogénèse. L'étude

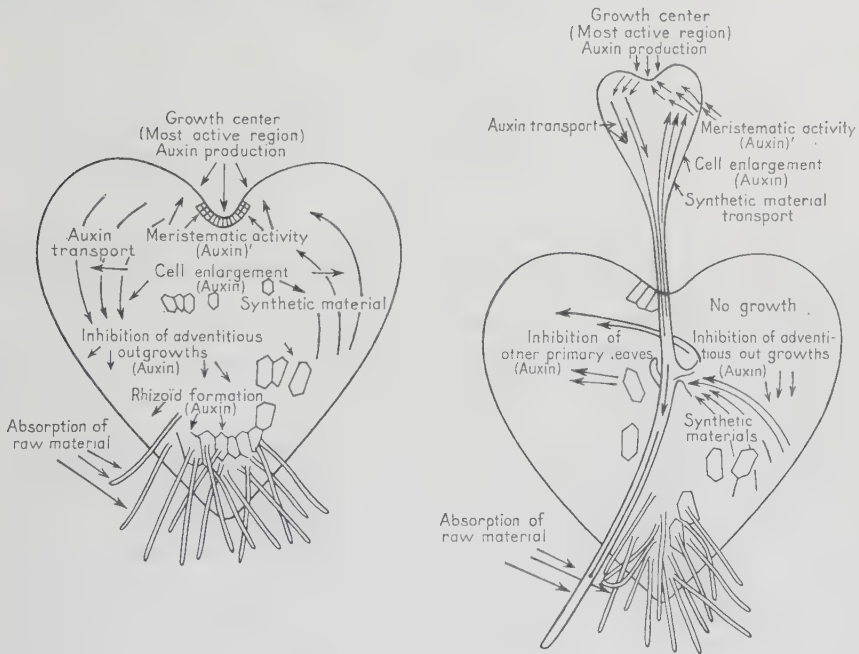


FIG. 5. — *Pteris longifolia*.

Répartition de l'auxine dans le prothalle et le jeune sporophyte.
(D'après ALBAUM.)

du développement des primordiums foliaires isolés a été menée à bien par STEEVES, SUSSEX, BRIGGS et CUTTER (1953 à 1961).

C'est à la suite de considérations phylogénétiques et en s'appuyant sur ces expériences, que WARDLAW (1955) a pu se prononcer en faveur de la théorie axiale et d'une conception biochimique de la morphogénèse, l'apex de chaque plante étant la première région morphogénétique de la plante.

Régénération chez les Fougères. — Un aspect particulier de la physiologie des Fougères a retenu très tôt l'attention des chercheurs; il s'agit du grand pouvoir de régénération de ces plantes. GÆBEL (1908,

1915); KNY (1872) et NAGAI (1914) ont admis que chacune des cellules du gamétotype est capable de redonner de nouveaux prothalles. Tout récemment (ITO, 1962), on a démontré expérimentalement que les cellules les plus éloignées du méristème apical du prothalle régénèrent plus aisément que celles qui en étaient les plus proches. Mais on a constaté, aussi, que de nouveaux prothalles pouvaient prendre naissance par aposporie sur les jeunes sporophytes. Les noms de DRUERY et BOWER (1884), HEINRICHER (1900), DIGBY (1905-1919), GÖBEL (1908), BEYERLEE (1932), etc., sont attachés à ces travaux. Miss LAWTON (1932, 1934) a cultivé aseptiquement des prothalles d'*Osmunda*; après formation des sporophytes sur ces prothalles, elle sectionne la première feuille qu'elle transporte sur un nouveau milieu nutritif. Ces feuilles donnent naissance, à partir de leur limbe, à des prothalles diplôides, sur lesquels se développent, après formation des organes sexuels et fécondation, de nouveaux sporophytes tétraploïdes.

M^{me} HUREL-PY (1951) a, elle aussi, obtenu la régénération de gamétophytes à partir de frondes sectionnées, ou même sur les racines et les feuilles demeurées attachées au prothalle.

Les premières frondes ne sont pas seulement capables de régénérer des prothalles, elles peuvent aussi, une fois sectionnées, donner naissance à de nouveaux sporophytes (VLADESCO, 1934).

C'est en faisant dévier le processus normal de ces régénérations, en essayant de bloquer la formation des bourgeons sporophytiques sur les tissus nouvellement formés, que quelques chercheurs ont voulu aboutir à de véritables cultures de tissus. Déjà difficile à obtenir à partir du gamétophyte (MOREL, 1950, 1956; MOREL et WETMORE, 1951; STEEVES et SUSSEX, 1952), leur réalisation est encore plus aléatoire à partir du sporophyte. MOREL (1956) obtient cependant à partir de la tige d'*Osmunda* privée de l'extrémité apicale, puis à partir de feuilles adultes d'*Adiantum pedatum*, la formation d'un parenchyme indifférencié; mais, dans le premier cas, la croissance a cessé après quelques passages, et, dans le second, le parenchyme a régénéré des bourgeons sporophytiques puis des plantules entières.

De même, la mise en culture du méristème apical du rhizome permet à MOREL (1950) de montrer qu'il est capable, comme celui des Angiospermes, de redonner la plante entière.

Plus tard, KADEJ (1960) a diversement traumatisé des racines restées en place de *Davallia solida*. S'il n'enlève, par une coupe transversale, que la coiffe, la racine continue normalement sa croissance. S'il enlève l'extrémité de la racine, de manière que la coupe passe par l'apicale, il y a parenchymatisation et formation d'un cal; par contre, s'il ne fait que détruire l'apicale d'un coup d'aiguille, deux nouvelles cellules apicales se reforment au bout de quelque temps et la croissance normale de la racine reprend.

Tout récemment (1962), BRISTOW a pu contrôler la différenciation

de cals dérivés de feuilles isolées de *Pteris cretica* et a montré que si le cal est privé d'une source exogène de sucre, aucun sporophyte ne se formait et il ne régénérât que des tissus gamétophytiques.

Cette vue d'ensemble sur les travaux réalisés sur les sporophytes de Fougères, nous montre l'orientation des recherches passées. Si les études du sporophyte adulte sont nombreuses et sa biologie mieux connue, il n'en est pas de même pour l'embryon et la jeune plantule. On remarquera aussi que peu de chose a été fait sur les relations prothalle-plantule ou sur les besoins de celle-ci *in vitro* (1). De nombreuses voies de recherches s'ouvrent donc dans ce domaine.

(1) Très récemment (1961), une dernière publication de DE MAGGIO vient de paraître à ce sujet; nous y reviendrons par la suite.

DEUXIÈME PARTIE

Comme nous l'avons vu, les facteurs de la morphogénèse du très jeune sporophyte de Fougère sont peu connus, il nous a donc semblé intéressant de les rechercher expérimentalement. Nous nous sommes donc proposé deux buts :

Cerner les facteurs nutritifs indispensables au développement normal, à partir du zygote, du sporophyte de *Pteris longifolia*. Puis, en comparant les cultures d'embryons isolés du prothalle et celles d'embryons portés par le prothalle, reconnaître ceux des facteurs apportés par ce dernier et essayer de déterminer son rôle dans l'embryogénèse.

Pour cela, nous avons mis au point des solutions nutritives variées, en nous aidant des recherches effectuées à la fois sur les prothalles, les sporophytes adultes (ALLSOPP, 1951 à 1956; SOSSOUNTZOV L., 1958) et les embryons d'Angiospermes (LA RUE, 1936; RAPPAPORT, 1954; RANDOLPH et REAYAT KHAN, 1960) et de Gymnospermes (BROWN et GIFFORD, 1958; SACHER, 1956), etc.

Nous avons ensuite ensemencé ces solutions, soit avec des spores, pour obtenir des prothalles porteurs de sporophytes, soit avec des embryons isolés selon la technique indiquée plus haut (p. 6).

Dans la nature, on peut distinguer, depuis la germination de l'embryon jusqu'à l'apparition des feuilles de type adulte, fertiles, plusieurs phases.

Dans nos cultures, ces phases successives nous ont servi de guide :

1° Il y a, d'abord, formation d'une jeune plantule, composée de la première feuille bilobée, parfois tétralobée, dite de type juvénile (cotylédon), et de la première racine.

2° Le deuxième phase du développement est marquée par une plantule à feuilles plus compliquées, mais encore de type juvénile.

3° Il y a ensuite apparition de feuilles du type définitif.

4° Enfin, la dernière phase est marquée par l'apparition de la fertilité.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA MORPHOGÉNÈSE DU SPOROPHYTE DE *PTERIS LONGIFOLIA*

A. — PLANTULES TÉMOINS

Le développement de la plantule commence par l'éclatement de l'enveloppe archégoniale, du côté du méristème apical du prothalle, sous la pression du « cotylédon »; presque simultanément, l'extrémité de la première racine perce aussi les parois archégoniales. Tandis que la première racine s'allonge, la première feuille, jamais enroulée en crosse, s'accroît par son pétiole pour donner une feuille à deux ou quatre lobes de type juvénile (fig. 6 A). A sa base, on trouve le point végétatif de la tige. La jeune plantule est reliée au prothalle par un suçoir ou pied. Dans les conditions naturelles, cette première phase dure environ trois mois. Ultérieurement, le système foliaire se complique. Les deuxième et troisième feuilles possèdent un plus grand nombre d'échancrures (fig. 6 B, 2 et 3). Le pétiole des feuilles suivantes porte plusieurs lobes, d'abord trois, puis cinq. Ceux-ci deviendront, dans les feuilles suivantes, des pennes. C'est à ce dernier moment seulement qu'il est possible de reconnaître l'espèce à laquelle appartient la plantule. Les sporanges apparaissent après un an et demi; le prothalle est alors, depuis longtemps, nécrosé et a disparu, le pivot s'est formé.

Nous avons suivi l'organogénèse depuis son début, elle est identique à celle de *Gymnogramme sulphurea* décrite par VLADESCO (1936) (fig. 7, A, B et C). Cet auteur avait d'ailleurs montré que l'ontogénèse est toujours identique chez toutes les Leptosporangiées.

B. — CULTURES « IN VITRO » DE PLANTULES PORTÉES PAR DES PROTHALLES

En 1958, M^{lle} Y. PARÈS a réussi à obtenir *in vitro*, sur liquide de Knop, oligo-éléments et en lumière continue, le développement de prothalles normaux de *Pteris longifolia*. Comme nous désirions étudier les plantules portées par les prothalles ainsi cultivés, nous avons refait ces expériences.

Au moment de l'ensemencement du liquide nutritif, des spores tombent au fond des tubes de cultures, d'autres flottent à la surface du milieu. Les premières germent en donnant naissance à des prothalles filamenteux submergés, les secondes à des prothalles normaux flottant à la surface du liquide nutritif. Nous avons donc suivi le développement des plantules portées par ces deux types de prothalles.

En surface, le jeune embryon apparaît à la

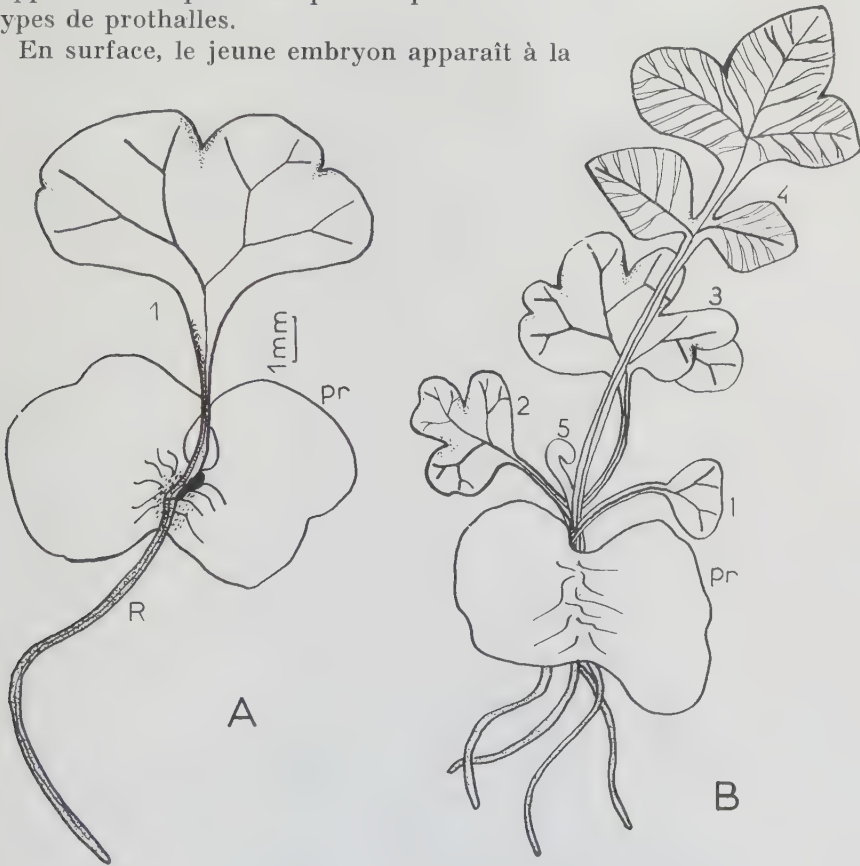


FIG. 6. — Plantule de *Pteris longifolia* développée sur terre de bruyère.

A. La première feuille (1) ou « cotylédon », de type juvénile est, ici, tétralobée (pr, prothalle; R, racine).

B. Deuxième phase du développement, complication du système foliaire, apparition des feuilles de type adulte (4).

face inférieure des prothalles, vingt-cinq ou trente jours après l'ensemencement des spores, sous forme d'une protubérance sphérique de 100 à 120 μ , surmontée d'un point brun qui est le col archégonial nécrosé. Cette sphère grossit rapidement, puis se déforme et l'enveloppe archégoniale éclate sous la pression du cotylédon, trente-cinq jours après la mise en culture. Les jours suivants, apparaît la racine. Généralement, après quarante-cinq jours, la jeune plantule est identique à

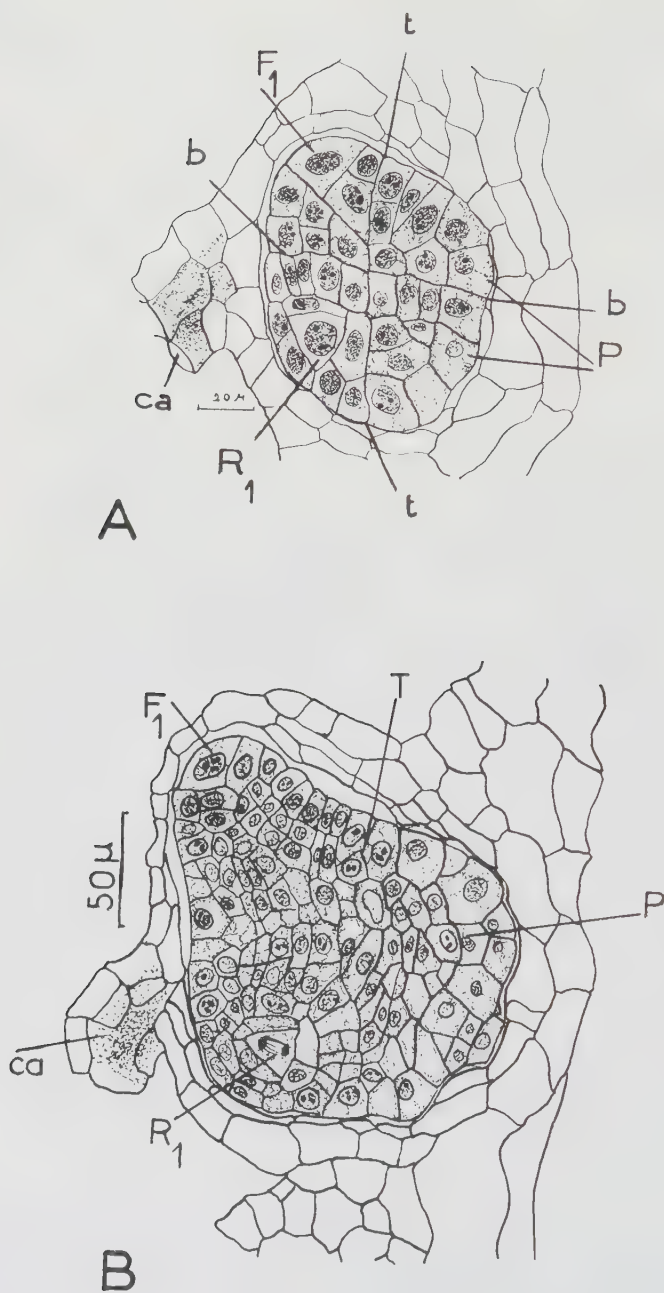


FIG. 7 a et b.

celle qui se serait développée sur terre de bruyère dans la nature. Sa vascularisation est bien visible par transparence (fig. 8 A).

La plantule comporte les quatre parties habituelles : la tige, la racine, le pied et la feuille de forme juvénile. Parfois, cependant, les échancrures foliaires sont en plus petit nombre que chez les plantules de la nature. Un peu plus tard, lorsque la troisième feuille s'est déroulée (fig. 8 B), on s'aperçoit qu'elle est formée de trois lobes; dans

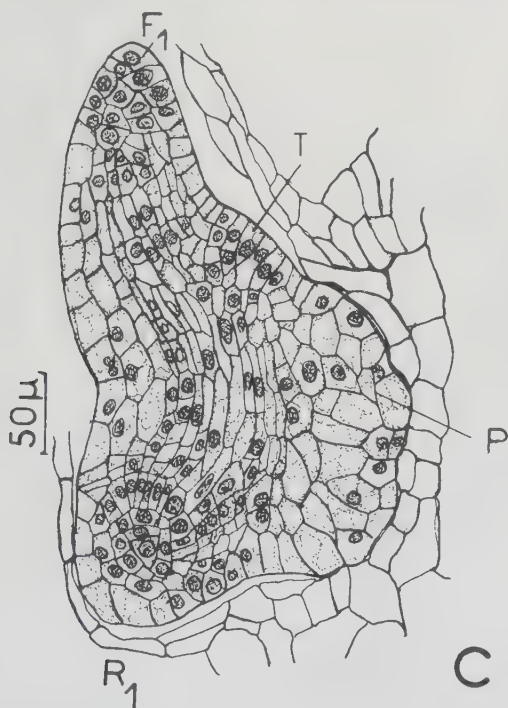


FIG. 7 c.

FIG. 7. — *Gymnogramme sulphurea*. Coupes longitudinales médianes à travers des embryons cultivés sur terre humide. (D'après VLADESCO.)

A. Embryon enfermé dans l'archégone; on distingue la paroi basale (*bb*) et la paroi transverse (*tt*), ainsi que la différenciation des organes embryonnaires (*F₁*), première feuille; *R₁*, première racine; *P*, pied; *ca*, col archégonial).

B. Embryon juste avant l'éclatement de l'enveloppe archégoniale. (*T*, initiale du point végétatif).

C. Embryon au moment de l'éclatement des parois archégoniales.

les conditions particulièrement favorables, quand les plantules sont bien éclairées, situées très en surface, et non serrées, quatre mois après ensemencement, la quatrième feuille est de forme adulte (fig. 8 B); parallèlement, un certain nombre de racines sont apparues.

Bientôt, toutes les feuilles nouvellement déroulées ont la forme de frondes adultes, elles mesurent 6 à 10 cm de longueur. L'espèce, à ce moment, est aisément reconnaissable et semblable en tout point aux

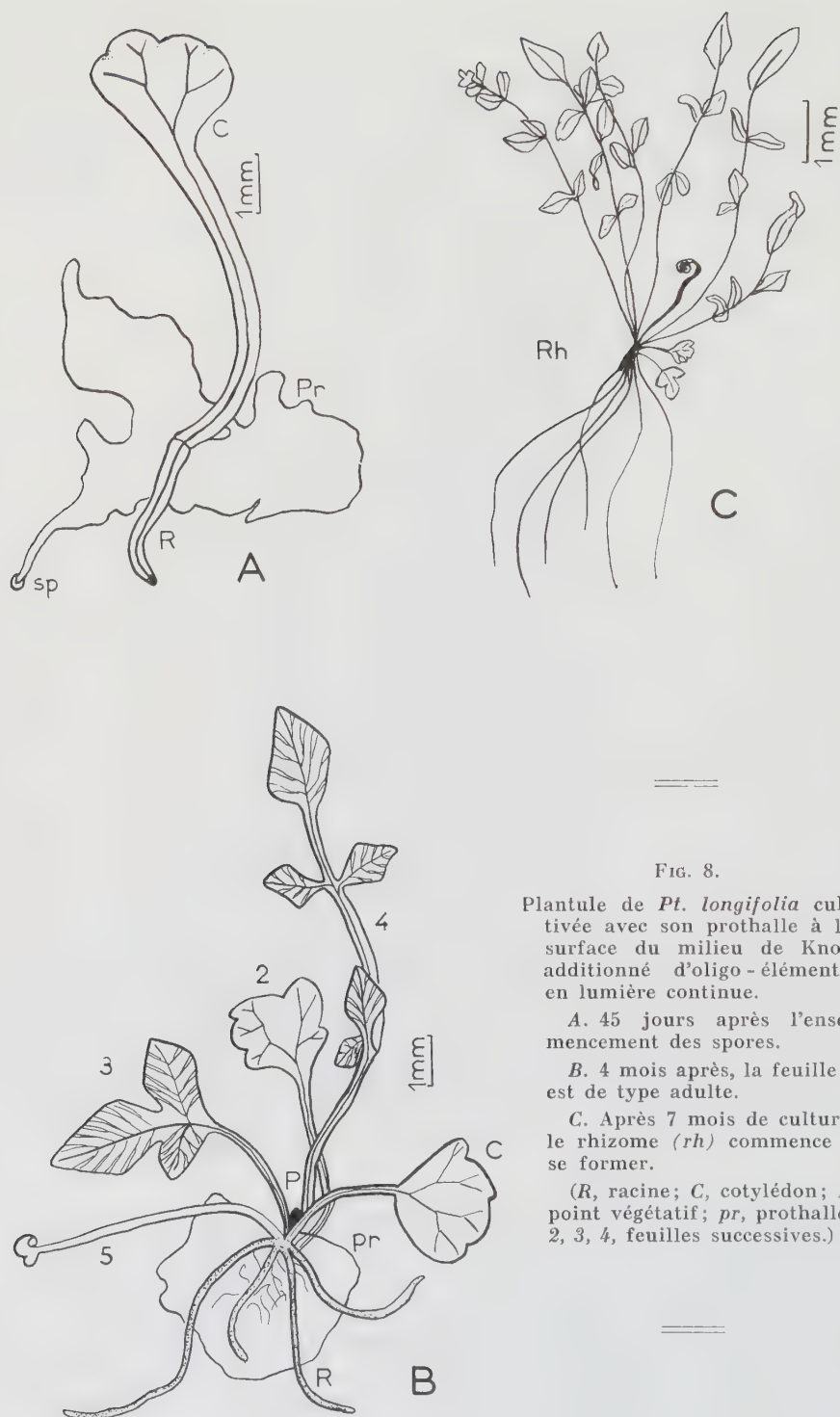


FIG. 8.

Plantule de *Pt. longifolia* cultivée avec son prothalle à la surface du milieu de Knop additionné d'oligo-éléments, en lumière continue.

A. 45 jours après l'ensemencement des spores.

B. 4 mois après, la feuille 4 est de type adulte.

C. Après 7 mois de culture, le rhizome (rh) commence à se former.

(R, racine; C, cotylédon; P, point végétatif; pr, prothalle; 2, 3, 4, feuilles successives.)

individus développés sur terre de bruyère. Au bout de sept mois de culture, la plante a huit à neuf feuilles, un nombre variable de racines et le rhizome commence à se former; pendant ce temps, le prothalle se nécrose progressivement (fig. 8 C).

Par contre, les spores tombées au fond des tubes ont donné naissance à des prothalles aberrants, plus ou moins filamenteux; quelques-uns, pourtant, sont porteurs de sporophytes dont le développement présente un net retard sur ceux qui se sont développés en surface; deux mois après l'ensemencement, les embryons sont encore inclus dans l'enveloppe archégoniale.

Ce n'est que plus tard qu'apparaissent les feuilles. Après quatre mois de culture par exemple, les plantules n'ont que trois feuilles et qu'une seule racine, elle-même très courte (fig. 9). L'édification des plantules peut se poursuivre, mais elle est loin d'être normale; l'apparition de feuilles de type juvénile continue longtemps (quatrième et cinquième feuille); de plus, il n'y a qu'une ou deux racines (fig. 10); les sporophytes se nécrosent, ensuite, très rapidement.

En suivant depuis son début l'organogénèse, nous avons pu constater qu'elle se déroule en milieu artificiel comme dans la nature (fig. 7). En particulier, il n'y a pas de changement dans les premières divisions; le développement des octants et la constitution des premiers organes de l'embryon sont identiques (fig. 2, p. 6).

Conclusions. — Comme M^{lle} Y. PARÈS, nous avons obtenu, quarante-cinq jours après l'ensemencement des spores, sur liquide de Knop non sucré, oligo-éléments et en lumière continue, l'apparition de plantules de *Pt. longifolia*.

— Nous avons suivi le développement de ces plantules. Il est identique, en tout point de vue (morphologie externe et ontogénèse), à celui que l'on observe dans les conditions naturelles. Toutefois, nous avons remarqué que, dans les conditions expérimentales, la sortie de la première racine ne s'effectue pas simultanément avec celle

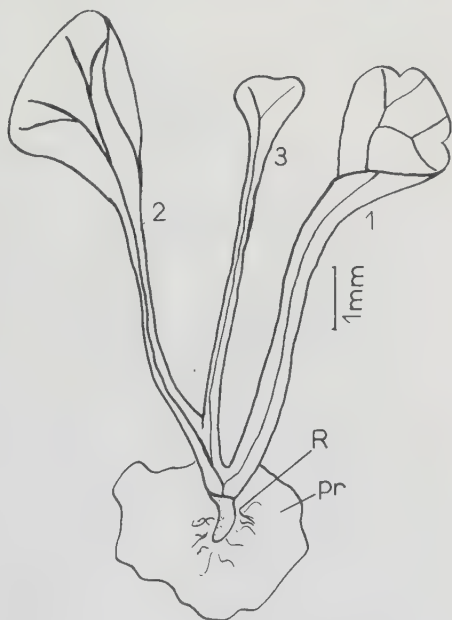


FIG. 9. — Plantule de 4 mois développée avec le prothalle au fond du tube de culture, sur liquide de Knop et oligo-éléments (R, racine; Pr, prothalle; 1, 2, 3, feuilles).

de la première feuille; elle n'a lieu que quelques jours plus tard seulement.

— De plus, la plantule de culture atteint le stade adulte, en sept mois; dans la nature, il faut attendre plus d'un an pour arriver au même résultat. Cette méthode se révèle donc intéressante pour obtenir



FIG. 10. — Plantule de 7 mois développée avec son prothalle au fond des tubes de culture, sur le même milieu que précédemment.

rapidement et en quantité suffisante du matériel pour nos expériences ultérieures.

— Lorsque les conditions optimales expérimentales, précédemment définies, ne sont pas réalisées, en particulier, si le développement des plantules s'effectue sur des prothalles submergés, le système racinaire est anormal et il n'y a que très tard formation de feuilles de type adulte.

C. — DÉVELOPPEMENT DES SPOROPHYTES ISOLÉS DU PROTHALLE

Pour cultiver les embryons isolés du prothalle selon la technique décrite plus haut (p. 6), nous avons utilisé différents milieux. Nous décrirons l'aspect des cultures sur chacun d'eux.

1° Milieu liquide entièrement minéral (Knop et oligo-éléments).

Nous avons vu que les embryons portés par les prothalles donnent très rapidement des plantules identiques à celles de la nature quand ils sont cultivés sur ce milieu, il nous a donc semblé logique de l'utiliser également pour les embryons isolés comme il a été indiqué (RIVIÈRES, 1959).

On observe, vingt-cinq à trente jours après isolement, la sortie par un côté des tissus archégoniaux nécrosés, d'une première feuille bilobée (fig. 11). Un certain nombre de feuilles se développent ensuite, de taille plus grande et de structure plus compliquée que la première, sans toutefois qu'apparaissent les feuilles de type adulte. Du côté opposé à la première feuille, les restes de l'archégone, nécrosés, sont toujours intacts : il n'y a pas de racine. Le développement des feuilles se poursuit, selon un rythme plus lent que pour les plantules portées par les prothalles. Trois mois et demi après isolement, on observe très souvent des plantules à sept feuilles juvéniles (fig. 12), mais toujours

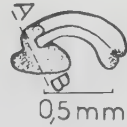


FIG. 11. — Jeune plantule de *Pt. longifolia* développée en 30 jours, à partir de zygote isolé, sur milieu Knop et oligo-éléments, en lumière continue. (Partie en pointillés : enveloppe archégoniale nécrosée et restes prothalliens.)

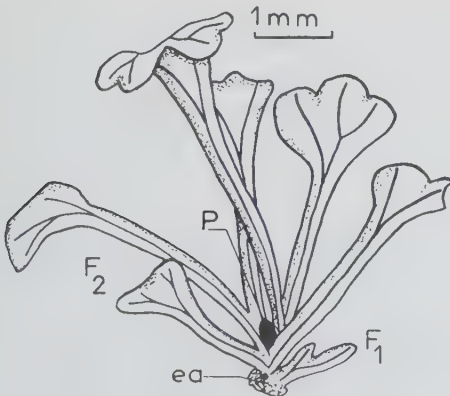


FIG. 12.

Plantule obtenue à partir d'embryons isolés, 3 mois et demi après sa mise en culture en milieu Knop et oligo-éléments en lumière continue (F_1 , F_2 , feuilles; ea, enveloppe archégoniale nécrosée; P, point végétatif).

sans racine. A partir de ce stade, la plantule commence à se nécroser, seuls restent verts la dernière feuille et le point végétatif de la tige.

Des coupes, faites à travers la partie de la plantule qui aurait dû donner une racine, c'est-à-dire « l'octant racine » de l'embryon, montrent que les cellules n'ont pas conservé l'aspect habituel de cet octant. A cette fin, on comparera les figures 7 B et 13. Si les cellules de la figure 7 B sont nettement méristématiques, par contre, dans la figure 13, bien que l'on reconnaisse un début d'organisation radicu-



FIG. 13.

Coupe selon la ligne AB, figure 11, de l'octant racine, d'une plantule isolée, cultivée en lumière continue sur milieu de Knop additionné d'oligo-éléments (*ea*, enveloppe archégoniale; *ca*, col archégonial; *i*, initiale probable de la racine manquante).

laire avec son apicale tétraédrique typique, les cellules sont plus grandes; elles ont cessé d'être isodiamétriques et l'on voit bien que le rapport nucléo-plasmatique est plus faible. Elles n'ont plus les caractères qui permettent de reconnaître des cellules méristématiques en activité; au contraire, il semble bien qu'elles aient perdu le pouvoir de se diviser et de s'allonger: elles ont déjà atteint un certain degré de différenciation.

Conclusions. — Le liquide de Knop, additionné de la dose habituelle d'oligo-éléments de Berthelot, permet le développement des embryons isolés de *Pt. longifolia* jusqu'à une dizaine de feuilles, mais:

— Il n'y a jamais formation de racines, même pas de la première.

Il y a bien organisation d'un apex radiculaire, mais les cellules de cet apex ne se divisent pas, elles en ont perdu le pouvoir.

— Les feuilles sont toutes du type juvénile.

— Les plantules ont une taille plus réduite et un développement plus lent que lorsqu'elles sont portées par les prothalles.

Etant donné que, dans les mêmes conditions de culture, les plantules cultivées avec leur prothalle produisent des racines, alors qu'elles n'en produisent pas quand elles sont isolées de leur support prothallien, *on peut conclure que c'est le prothalle qui a élaboré, à partir des sels minéraux du milieu, sous l'action de la lumière, toutes les substances nécessaires à la rhizogénèse et au développement des feuilles du type adulte.*

Discussion. — Pourtant, à la suite des travaux sur les cultures de racines de blé en milieu liquide (WHITE, 1932), de ceux sur la rhizogénèse et sur les cultures de tissus, on pourrait penser que nos cultures, effectuées sous une mince couche de liquide, sans aucun contact avec l'air, ne peuvent se développer normalement ce qui entraînerait la non-formation de la racine.

Cette absence de racine pourrait aussi s'expliquer par une « adaptation » de la plantule aux conditions de culture; c'est l'opinion de STONE (1958) qui étudiant dans les conditions naturelles l'embryon de *Polyphlebium venosum* espèce hydrophile, a constaté l'absence de la première racine, les autres se développant normalement.

Nous avons donc effectué deux sortes d'expériences : en milieu solide, les conditions d'asphyxie sont supprimées (1); en milieu agité, l'oxygénation est assurée tandis que l'adaptation pourra jouer.

2° Milieu liquide minéral oxygéné.

Nous avons entrepris de nombreux essais en milieu Knop et oligo-éléments agité. Malgré tous nos efforts, nous n'avons obtenu que peu de résultats. Cependant (fig. 14), nous avons pu constater, après vingt jours de culture, la sortie de la première feuille et l'absence de la première racine. Les cellules du méristème radiculaire sont pourtant présentes, mais elles ne se sont pas divisées et les coupes effectuées dans l'apex montrent des cellules hypertrophiées et vacuolisées. Ces coupes sont identiques à celles obtenues avec les milieux solides (fig. 18). Les plantules n'ont pas pour-



FIG. 14. — Jeune plantule isolée de 20 jours, cultivée en milieu Knop et oligo-éléments agité (Fille, feuille; ea, restes prothalliens).

(1) Des conditions asphyxiques existent tout de même pour les racines qui auraient pénétré dans la gélose, mais la formation de la première racine s'effectue forcément au contact de l'air, les archégones embryonnés étant disposés, au moment de l'ensemencement, à la surface de la gélose, le col dirigé vers le haut.

suivi leur développement et se sont nécrosées au bout d'un mois et demi. Cela nous a permis de constater que l'oxygénation du milieu, à elle seule, n'a pu assurer la formation d'une première racine normale.

Ce qui peut sembler anormal, car l'on sait que l'oxygène est essentiel à la rhizogénèse (BOUILLENNE, 1951).

3° Milieu minéral solide.

Le même milieu, liquide de Knop additionné d'oligo-éléments, a été solidifié par adjonction de 0,5 à 1 % de gélose. (Celle-ci a été purifiée par lavage de vingt-quatre heures, comme l'indique M^{me} PARIS [1955], afin d'éliminer les impuretés, en particulier les substances de croissance qu'elle pourrait contenir.) Comme on pourrait toujours nous objecter que la gélose n'est pas entièrement pure de substances de

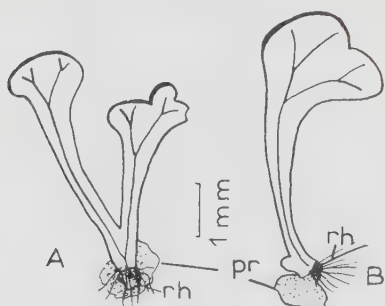


FIG. 15.

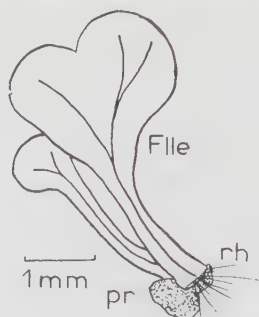


FIG. 16.

FIG. 15. — A. embryon de 25 jours cultivé en milieu Knop et oligo-éléments avec 0,5 % de gélose. B. même expérience, mais avec 1 % de gélose (rh, rhizoïdes; pr, restes archégoniaux).

FIG. 16. — Plantule de *Pt. longifolia*, 50 jours après son isolement, cultivée sur milieu de Knop et oligo-éléments, gélosé à 1 % (Flle, feuille; rh, rhizoïde; pr, restes prothalliens).

croissance, même après ce long lavage, nous avons refait la même expérience en utilisant des silico-gels. Cependant, dans aucune de ces deux catégories d'expériences, une première racine ne s'est formée.

Dans les milieux à 0,5 % de gélose, la première feuille ne tarde pas à sortir de l'enveloppe archégoniale nécrosée; au bout de vingt-cinq jours environ, la plantule possède souvent deux feuilles, alors que dans les milieux à 1 % de gélose il n'y en a, en général, qu'une (fig. 15 A et B). Mais, nous n'assistons jamais, quel que soit le milieu utilisé, à la sortie de la première racine. Tout au plus, à son emplacement, trouve-t-on quelques filaments semblables à des rhizoïdes (fig. 15; rh). De nouvelles feuilles apparaissent régulièrement, tout en restant de forme juvénile; le retard constaté pour les milieux à 1 % de gélose reste net (fig. 16). Après deux mois de culture (fig. 17), les

plantules des milieux à 0,5 % possèdent déjà cinq feuilles; à la base de la cinquième feuille, une racine parfaitement normale, comme le montre sa couleur, ses poils, son allongement, etc., se forme. L'apparition des feuilles se poursuit ensuite, sans qu'il y ait de nouvelles

FIG. 17.

Plantule de *Pt. longifolia* de 45 jours, cultivée isolément sur milieu Knop et additionné d'oligo-éléments avec 0,5 % de gélose; noter l'apparition de la racine *r* à la base de la feuille 5 (1° R, emplacement de la racine correspondant à la première feuille).

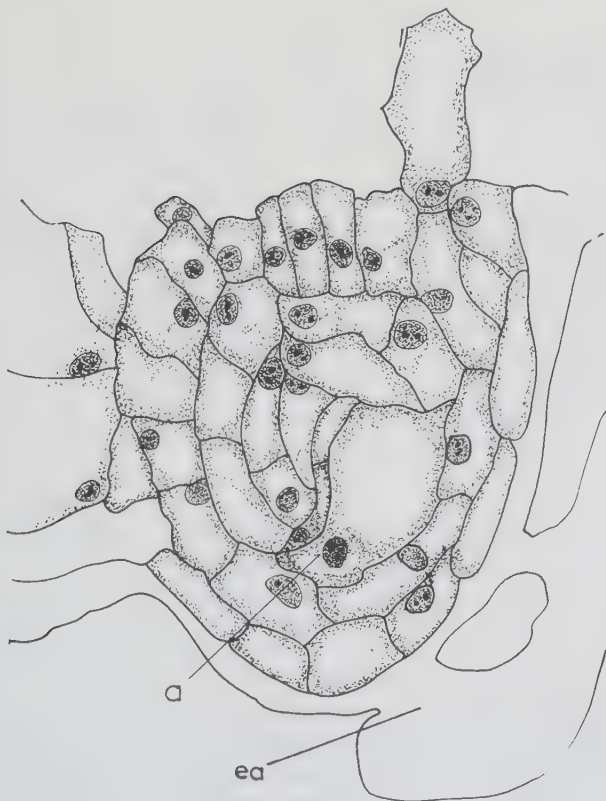
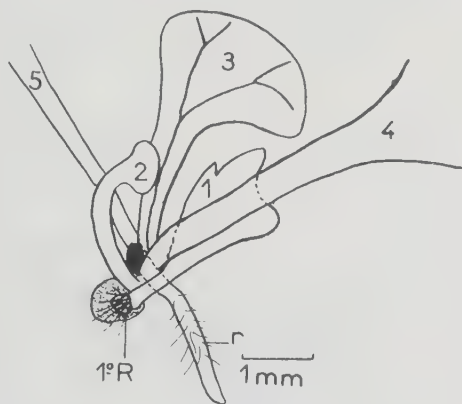


FIG. 18. — *Pteris longifolia*. Coupe longitudinale effectuée à l'endroit où aurait dû se développer la première racine; son initiale *a* est présente, mais toutes les cellules tendent à perdre leur aspect méristématique caractéristique, en particulier elles se vacuolisent (*ea*, enveloppe archégoniale).

racines. Dans les milieux gélosés à 1 %, une racine se forme aussi à la base de la cinquième ou de la sixième feuille, mais après trois mois de culture seulement.

Des coupes, effectuées au niveau de l'endroit où manque la racine de la première feuille, montrent, sous l'enveloppe archégoniale nécrosée (fig. 18), un apex radiculaire reconnaissable; quelques-unes

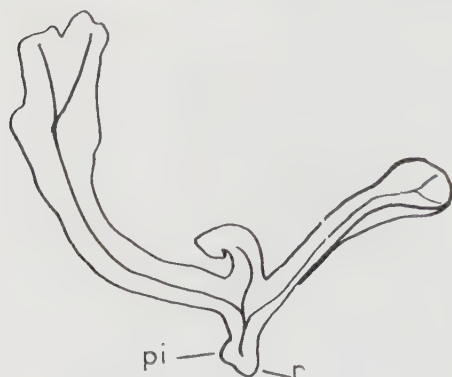


FIG. 19. — Plantule de *Pt. longifolia* de 1 mois, cultivée isolément sur gel de silice (*pi*, pied; *r*, racine non développée).

de ses cellules se sont divisées, mais les divisions ont bientôt cessé en même temps que disparaissent les caractères auxquels on reconnaît habituellement des cellules en pleine activité mitotique (grosseur des noyaux, des cellules, intensité de la coloration, etc.). Nous avons constaté que cet apex ne recouvre, à aucun moment, la faculté de se diviser et les cellules déjà formées ne se sont pas allongées.

Sur gel de silice, nous n'avons obtenu le développement des plantules que jusqu'à la troisième feuille; la première racine n'est pas apparue (fig. 19).

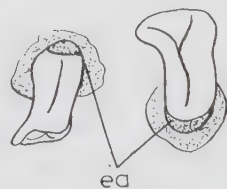
— Le développement des embryons isolés est donc possible en milieu solide. Nous avons obtenu des plantules à grand nombre de feuilles. La formation de frondes juvéniles persiste longtemps.

— La racine correspondant à la première feuille n'apparaît pas; cependant, des racines peuvent se développer à la base de la cinquième ou de la sixième feuille.

— Le développement est plus lent en milieu solide qu'en milieu

FIG. 20. — *Acrostichum aureum*.

Plantules obtenues après 30 jours de culture, à partir d'embryons isolés, sur milieu de Knop additionné d'oligo-éléments en lumière continue. Noter l'absence de racine (*ea*, restes de l'enveloppe archégoniale).



liquide. Le fait de cultiver les embryons en milieu solide semblerait avoir une influence sur la rhizogénèse puisqu'il y a formation de racines lorsqu'un certain nombre de feuilles se sont formées. Mais la racine correspondant aux premières feuilles ne se développe pas, le nombre des feuilles de type juvénile est plus grand et les plantules restent plus petites que normalement.

L'examen des résultats des deux chapitres précédents nous permet

cependant de retenir que l'absence de racine sur les cultures en milieu liquide peut difficilement s'interpréter comme une adaptation aux conditions de vie hydrophytique, comme le pense STONE, puisque les premières racines ne se forment pas non plus en milieu solide. De plus, on pourrait aussi se demander pourquoi les embryons cultivés, avec leur prothalle en milieu liquide, portent, eux, des racines.

Enfin, nous avons pu montrer que les embryons d'une Fougère de la Mangrove intertropicale, *Acrostichum aureum*, espèce menant normalement une vie aquatique, ne porte pas de racine, comme *Pteris*, lorsqu'on isole le zygote et qu'on le cultive sur le liquide de Knop additionné d'oligo-éléments. Les expériences que nous avons faites sont probantes (fig. 20).

On pourrait penser aussi que la présence d'oxygène au moment de la formation de la racine, dans le cas des cultures en milieu solide, favorise le développement de la racine apparue à la base de la cinquième feuille; pourquoi alors n'agit-il pas aussi sur le développement de celle de la première feuille? A la suite de nouvelles expériences, nous expliquerons ce développement, qui peut paraître anormal, et nous verrons que l'oxygène n'est pas la cause de la rhizogénèse.

Après cette première série d'investigations, l'un des aspects du rôle du prothalle est maintenant déterminé : c'est de lui que dépendent la rhizogénèse et l'apparition des feuilles de type adulte; par contre, l'apparition des feuilles juvéniles est du ressort de l'embryon lui-même.

En effet, isolé, comme nous l'avons fait, lorsque les initiales de la première feuille et de la première racine sont formées (stade de la figure 2), l'embryon est capable de synthétiser, à partir des éléments minéraux du milieu, les substances nécessaires au développement du cotylédon et du point végétatif. Cependant, seules des feuilles du type juvénile se formeront : la présence du prothalle est indispensable à la rhizogénèse. Il est donc vraisemblable que le gamétophyte élabore une ou plusieurs substances permettant le développement ultérieur de l'octant donnant normalement la racine, en maintenant l'état juvénile méristématique de celui-ci.

4° Action des auxines.

Nos premières tentatives, faites avec un milieu simple, n'ayant pu conduire à un développement complet, nous avons eu recours, alors, aux substances de divisions. Nous avons mis au point un milieu de culture contenant des auxines. Outre leur action stimulante dans la multiplication cellulaire, on sait qu'elles jouent un rôle important dans l'initiation des primordia radiculaires. De plus, ALBAUM (1938) a montré que l'apex du prothalle est justement un centre producteur d'auxine. Isoler le très jeune sporophyte de son support prothallien revient à le priver de cette substance; nous avons pensé à lui en fournir dans nos milieux artificiels.

TABLEAU I. — RÔLE DES AUXINES

MILIEU DE BASE UTILISÉ ADDITIONNÉ DE	A I A (fig. 21-22)						A N A (fig. 23)		2-4 D (fig. 24)	
	10^{-3} 10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-8}
Influence	Toxique.	+	+	+	Peu nette.		+		Toxique.	+
Délai d'apparition de la 1 ^{re} feuille		10 jours dans 80 % des cas.	10 jours dans 80 % des cas.	10 jours dans 20 % des cas.			25 jours.			25 jours.
Feuilles supplémen- taires		0	0	0			0 Accrois- sement du limbe de la 1 ^{re} feuille.			Plusieurs mais anormales.
1 ^{re} racine		0	0	0			0 Pas de gonflement.			0
Nécrose		2 mois.	2 mois.	2 mois 1/2.			2 mois 1/2.			4 mois.

Nous avons ajouté à la solution de base, Knop et oligo-éléments, trois sortes d'auxines : l'acide indol-acétique (A I A), l'acide naphtalène-acétique (A N A) et l'acide 2-4 dichlorophénoxy-acétique (2-4 D).

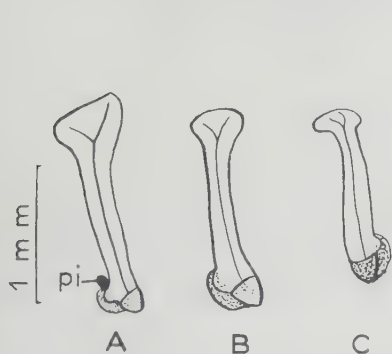


FIG. 21. — *Pteris longifolia*. Plantules de 10 à 15 jours cultivées isolées, sur milieu Knop, oligo-éléments avec 10^{-5} g/l (A); 10^{-6} g/l (B); 10^{-7} g/l (C) d'acide indol-acétique (pi, point végétatif).

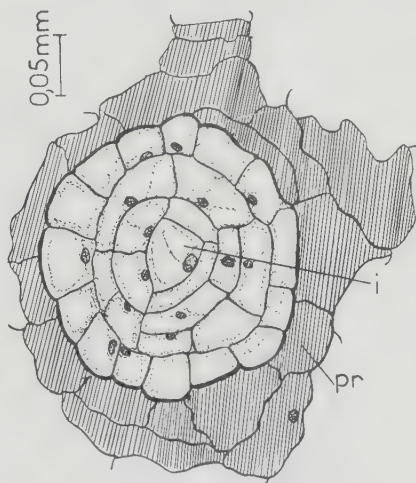


FIG. 22.

FIG. 22. — Coupe transversale effectuée à travers le méristème racinaire d'une plantule de 1 mois 1/2 cultivée sur milieu Knop, oligo-éléments, additionné de 10^{-7} g/l d'A I A (i, initiale; cellules ombrées = cellules de l'enveloppe archégoniale nécrosée).



FIG. 23. — Plantules de *Pt. longifolia* cultivées durant 1 mois (A) et 2 mois 1/2 (B) sur milieu contenant 10^{-6} g/l d'A N A.

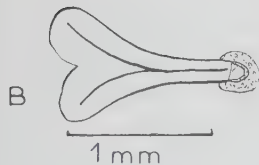


FIG. 23.



FIG. 24. — Plantules cultivées isolément en présence de 10^{-8} g/l de 2-4 D. A, pendant 20 jours; B, pendant 3 mois 1/2.

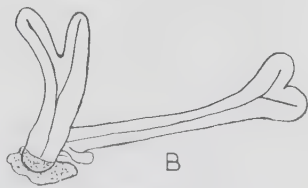


FIG. 24.

Nous avons établi, pour chacune d'entre elles, toute une gamme de concentrations, en utilisant surtout celles que l'on recommande généralement pour les cultures de tissus (GAUTHERET, 1959).

Pour abrégé notre exposé, nous avons présenté nos résultats sous forme de tableaux.

De la lecture du tableau I et des figures correspondantes, nous pouvons retenir que :

1° Le début du développement des embryons isolés est possible sur les milieux contenant des auxines, on y observe l'apparition de plantules arhizes.

2° La première racine reste incluse dans l'enveloppe archégoniale nécrosée. Cependant, en présence d'A I A, on peut observer une augmentation de volume de la partie qui devrait donner cet organe.

3° Le développement foliaire est perturbé, on n'observe que des feuilles juvéniles, le plus souvent aberrantes, surtout avec le 2-4 D.

5° Influence des vitamines.

On a prouvé que les vitamines du groupe B, la biotine, la thiamine ou, dans certains cas, la thiamine jointe à la pyridoxine et à l'acide nicotinique, peuvent jouer un rôle dans le développement des racines *in vitro* (BONNER, 1937, 1938, 1940; BONNER et ADDICOTT, 1937; ROB-

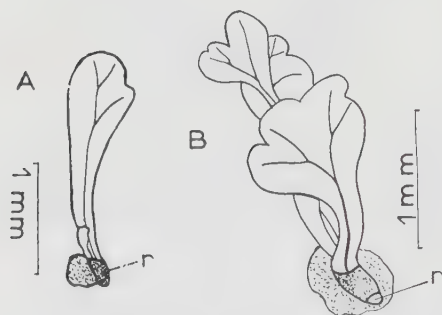


FIG. 25.

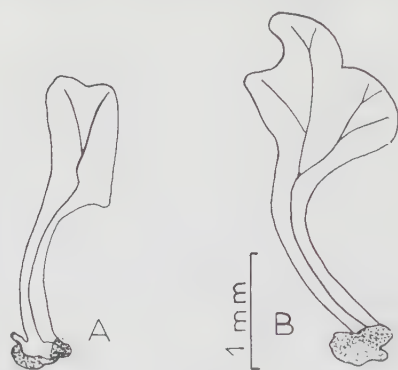


FIG. 26.

FIG. 25. — Plantules isolées sur milieu contenant 10^{-6} g/l de thiamine. A, 20 jours; B, 2 mois 1/2 (r, racine).

FIG. 26. — *Pteris longifolia*. Plantules isolées de 20 jours, développées en milieu Knop, oligo-éléments et 10^{-4} g/l de thiamine. Noter la forme anormale des feuilles.

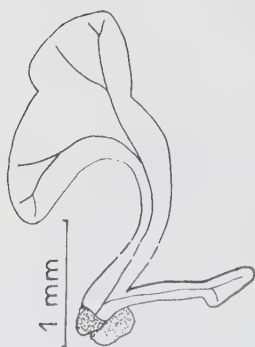


FIG. 27.

FIG. 27. — *Pteris longifolia*. Plantule de 20 jours cultivées sur liquide de Knop, oligo-éléments et 10^{-8} g/l d'aneurine.

FIG. 28. — Plantules de *Pteris*, cultivées isolées pendant 30 jours, en présence de 10^{-6} g/l de biotine. Noter l'extrémité r, de la racine qui a percé l'enveloppe archégoniale.

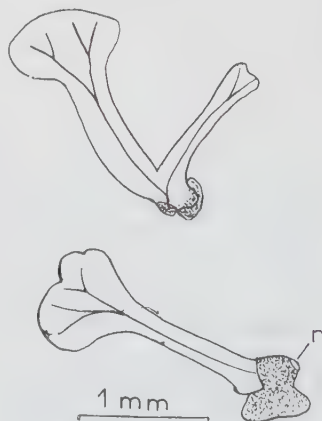


FIG. 28.

TABLEAU II. — RÔLE DES VITAMINES

MILIEU UTILISÉ	K + N +									
	THIAMINE			BIOTINE			MÉSO-INOSITOL		MÉLANGE DE VITAMINES	
	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}	10^{-4}	10^{-6}		
	Fig. 26.	Fig. 25.	Fig. 27.	Fig. 28.	Fig. 30 et 31.	Fig. 29.			Fig. 32 A et B.	Fig. 33, 34 et 35
Apparition de la 1 ^{re} feuille	20 jours.	20 jours.	25 jours.	20 jours.	20 jours.		30 jours.	20 jours.		15 jours.
Feuilles supplémentaires	1 à 2 anormales.	2 à 3.	1 jamais anormale.	1 à 2.	3 feuilles à 2 mois 1/2 normales.	2 feuilles anormales à 1 mois.	3 feuilles à 2 mois 1/2.	3 feuilles à 40 jours.		2 à 4 feuilles anormales à 2 mois 1/2.
1 ^{re} racine	0	Saillie de l'extrémité.		Rare saillie.	0	0	Saillie sans allongement.	0		Gonflement de la partie radiculaire.

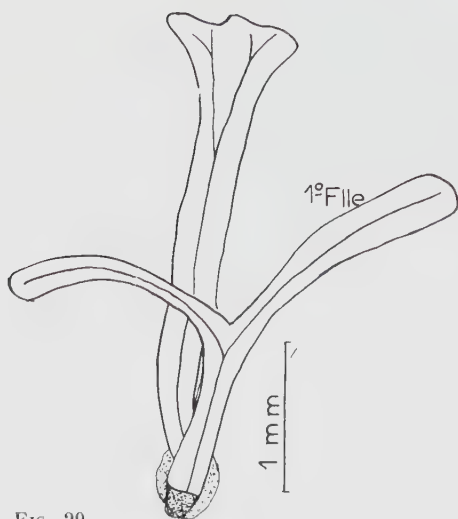


FIG. 29.

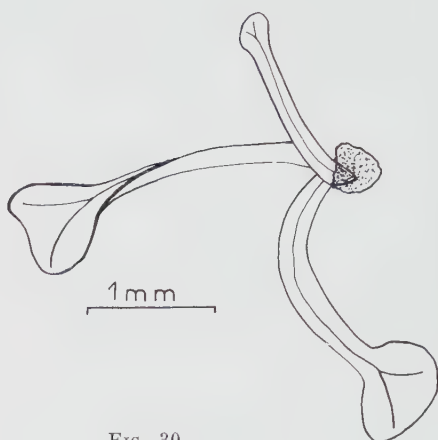


FIG. 30.

FIG. 29. — Plantule de 1 mois cultivée avec 10^{-10} g/l de biotine. Remarquer la première feuille anormalement divisée (*Feuille*).

FIG. 30. — *Pteris longifolia*. Plantule de 2 mois 1/2 ayant poussé sur milieu Knop, oligo-éléments et 10^{-8} g/l de biotine.

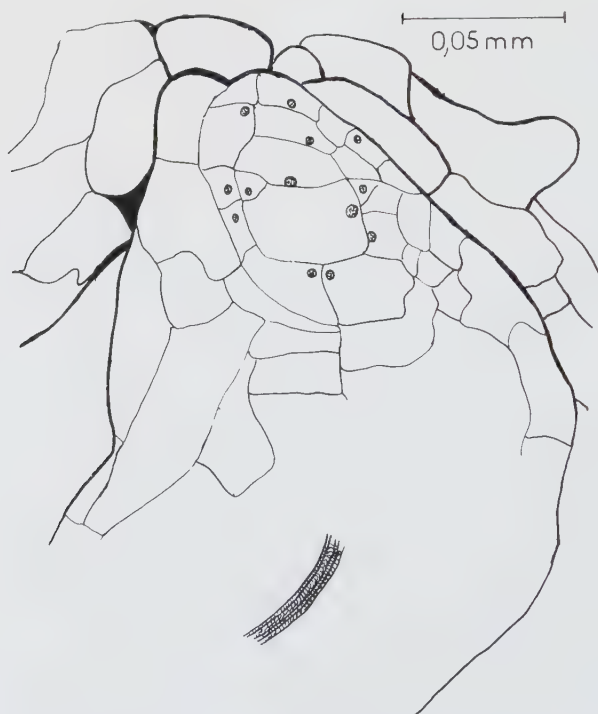


FIG. 31. — Coupe longitudinale à l'endroit où manque la première racine d'une plantule de *Pteris* de 2 mois 1/2, cultivée en présence de 10^{-8} g/l de biotine.

BINS, 1939; ROBBINS et SCHMIDT, 1937, 1939; ROBBINS, 1939; ADDICOTT et DERIVIAN, 1939; ADDICOTT, 1941; CHAMPAGNAT, 1961, etc.) et sont indispensables pour celui des embryons immatures isolés (RAPPAPO, 1954) et pour certaines cultures de tissus (GAUTHERET, 1959; M^{lle} PARIS, 1958). Comme il semble probable que le prothalle adulte synthétise

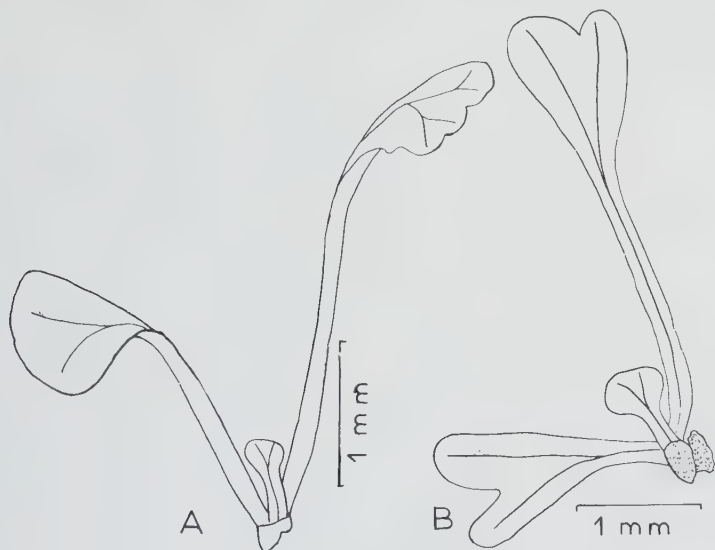


FIG. 32. — *Pteris longifolia*.

Aspect des cultures en présence de méso-inositol.

A, 10^{-4} g/l, plantule de 2 mois 1/2; B, 10^{-6} g/l, plantule de 30 jours.

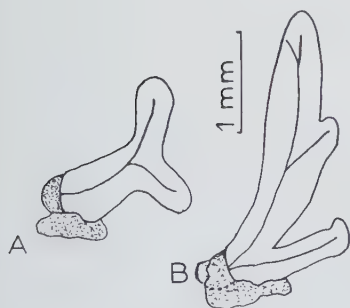


FIG. 33.

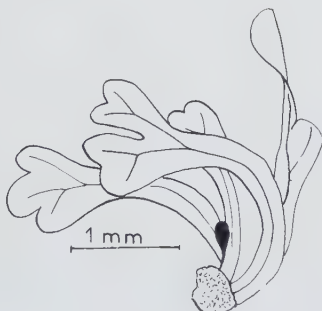


FIG. 34.

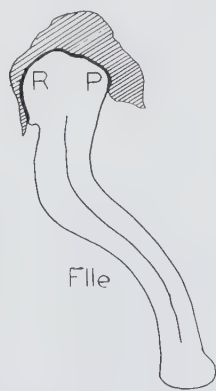


FIG. 35.

FIG. 33. — Plantules isolées depuis 15 jours sur milieu de Knop additionné d'un mélange de vitamines du groupe B.

FIG. 34. — *Pteris longifolia*. Mêmes conditions de culture que dans la figure précédente, plantules de 75 jours.

FIG. 35. — *Pteris longifolia*. Schéma d'une coupe longitudinale schématisée d'une plantule cultivée 45 jours sur milieu vitaminé (Flle, feuille; R, racine non développée; P, pied).

pour ses propres besoins et ceux du jeune embryon, outre les auxines, un certain nombre de vitamines, nous en avons fourni au jeune embryon isolé, privé de cet apport prothallien.

Nous avons principalement utilisé celles qui sont employées habituellement pour les cultures de tissus, c'est-à-dire : la thiamine, la biotine et le méso-inositol, séparément, ou en mélange à diverses concentrations.

Nous avons préparé les solutions suivantes :

- Knop, oligo-éléments et thiamine 10^{-4} à 10^{-8} g/litre;
- Knop, oligo-éléments et biotine 10^{-6} à 10^{-10} g/litre;
- Knop, oligo-éléments et méso-inositol 10^{-2} à 10^{-6} g/litre.

A la suite de ces premiers essais, nous avons mis au point un milieu contenant un mélange de vitamines aux concentrations suivantes :

Knop, oligo-éléments + thiamine 10^{-6} + biotine 10^{-8} + inositol 10^{-4} g/litre. De telles concentrations de ces mêmes corps ont déjà été utilisées pour les cultures de cals de gamétophytes de Fougères (MOREL et WETMORE, 1951).

Comme pour les milieux contenant des auxines, nous présentons les résultats sous forme de tableau.

Après l'examen du tableau II et des figures correspondantes, nous retiendrons que :

1° Les vitamines, pas plus que les auxines, ne permettent le développement normal des sporophytes isolés de *Pteris longifolia*.

2° Certaines déterminent même, la tératologie du système foliaire.

3° Bien qu'ayant une légère action sur l'octant qui devrait donner la racine, action se traduisant par une simple augmentation de volume de cet octant, ou au maximum par l'apparition d'une ébauche de racicule (fig. 28; 25 B), les vitamines, à elles seules, ne permettent pas la rhizogénèse normale. Sur des coupes longitudinales de la partie radiculaire (fig. 31), on remarque la présence de cellules hypertrophiées ayant atteint un certain degré de différenciation, et, souvent, on constate que la racine reste incluse dans les tissus archégoniaux nécrosés.

Nous avons donc cherché ailleurs, le facteur déclenchant l'allongement de la première racine, la formation de nouveaux méristèmes radiculaires et l'apparition des feuilles adultes. Ce facteur une fois déterminé, nous étudierons l'effet des auxines et des vitamines sur le développement.

Peut-être ces substances agiront-elles tout de même sur la morphogénèse; mais il est intéressant de souligner qu'elles n'en sont pas les facteurs principaux.

6° Rôle du glucose.

Après avoir mis en évidence que les hormones et les vitamines, à elles seules, n'avaient aucune ou très peu d'action sur la morphogénèse des jeunes sporophytes séparés du prothalle, nous nous

sommes demandé si un embryon isolé n'ayant que sa première feuille, effectue une photosynthèse suffisante pour rendre la jeune plantule complètement autotrophe même en lumière continue, conditions que les expériences précédentes avaient montrées comme étant les plus favorables à la croissance. On sait, en effet, que dans certains cas, l'initiation de primordia radiculaires à la base des boutures ne peut se faire, même en présence d'auxine, parce qu'il manque un facteur qui induira, sous l'action de l'auxine, la rhizogénèse. Peut-être suffirait-il, pour obtenir un développement complet de l'embryon, de combler ce déficit éventuel en substances carbonées.

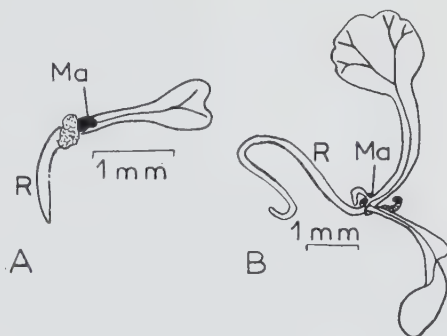
Pour nous en rendre compte, nous avons ajouté, au milieu de base, du glucose et avons placé nos cultures sous un éclairage de douze

=====

FIG. 36.

Plantules isolées sur milieu Knop, oligo-éléments et 2 % de glucose. A, 7 jours; B, 15 jours (Ma, méristème apical; R, racine).

=====



heures par jour. La formule du milieu nutritif devient alors la suivante :

Liquide de Knop, 0,5 cm³/litre de la solution oligo-dynamique de Berthelot et 2 % de glucose.

Sept jours après l'isolement, l'embryon a développé une première feuille juvénile, suivie d'une première racine (fig. 36 A). Après deux semaines, deux feuilles se sont formées, ainsi qu'une deuxième racine. Nous avons noté l'aspect grêle de ces racines, qui sont très allongées et contournées sur elles-mêmes (fig. 36 B). Deux mois après la mise en culture, nous avons effectué un premier repiquage, alors que les plantules mesuraient 2 à 3 cm de longueur (fig. 37). Après trois mois de culture (fig. 38), nous avons obtenu des plantules de 10 cm de hauteur, semblables à celles développées sur terre de bruyère. L'espèce est aisément reconnaissable puisque les feuilles qui apparaissent ont maintenant la forme de frondes adultes. Les individus possèdent, en outre, plusieurs racines. Après un nouveau repiquage, toujours sur ce même milieu, mais en Erlenmeyer cette fois, les plantes croissent rapidement; elles mesurent de 15 à 20 cm, après huit à neuf mois. Elles ont un grand nombre de feuilles du type adulte (de 10 à 20) et de nombreuses racines enchevêtrées (fig. 39). Afin d'obtenir des plantes

fertiles, comme SUSSEX et STEEVES (1957-1958) qui ont provoqué, à partir de primordia foliaires isolés du rhizome de *Todea barbara* et *Osmunda*, le développement de frondes porteuses de sporanges en

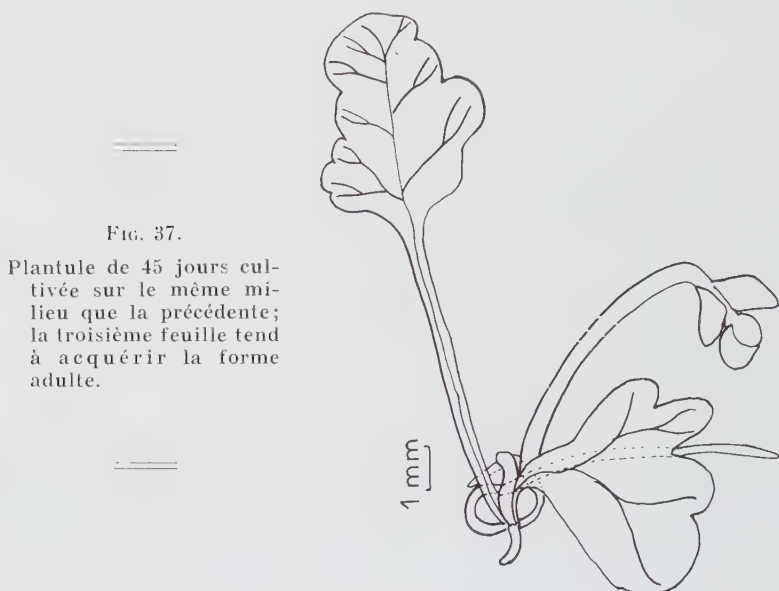


FIG. 37.

Plantule de 45 jours cultivée sur le même milieu que la précédente; la troisième feuille tend à acquérir la forme adulte.

les cultivant sur de fortes concentrations de sucre (4 à 6 %), nous avons effectué des repiquages de nos plantes, âgées de huit mois, dans les trois liquides contenant des concentrations différentes de glucose :

- 1° Knop, oligo-éléments, glucose 2 %.
- 2° Knop, oligo-éléments, glucose 4 %.
- 3° Knop, oligo-éléments, glucose 6 %.

Dans le premier milieu, la plante continue sa croissance. Le limbe de certaines feuilles se replie vers la face inférieure. Au bout de deux ans et demi, la nécrose s'est manifestée et les expériences ont dû être interrompues.

A la fin de cette expérience, pour vérifier si les feuilles étaient devenues fertiles, nous avons fait des coupes transversales comparatives à travers les pennes de *Pteris* récoltés en serres et des frondes de culture. Nous avons pu nous rendre compte que la fausse indusie, caractéristique de l'espèce, se formait. Cependant, la culture n'ayant pas été poursuivie assez longtemps, nous n'avons pas vu les sporanges, pas même les premiers recloisonnements. La figure 40 A et B permet de comparer une feuille de culture et une fronde de plante de serre.

Avec les deux autres concentrations, quelques jours après le repiquage, toutes les frondes présentes se sont nécrosées, puis l'apex resté vivant en reforma de nouvelles. Comme dans le cas précédent, la fausse indusie s'est formée, sans toutefois recouvrir des sporanges. Peu après, la nécrose s'est installée.



FIG. 38.

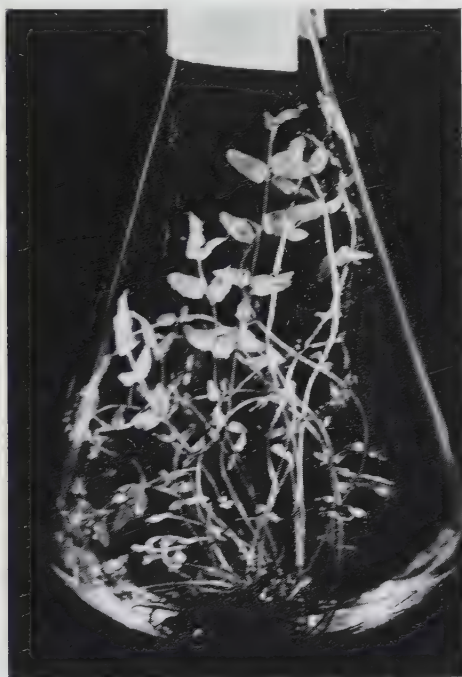


FIG. 39.

FIG. 38. — Plantule de 3 mois cultivée comme la précédente.

FIG. 39. — Plante adulte après 9 mois de culture en milieu de Knop additionné d'oligo-éléments et glucosé.

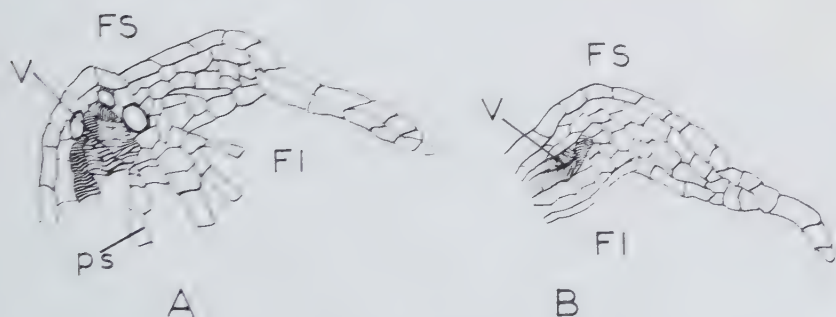


FIG. 40. — Coupe transversale dans le penna de *Pt. longifolia*. A, plante de serre; B, plante de culture. FS, face supérieure; FI, face inférieure; V, vascularisation; ps, pédoncule sporangifère.

Nous avons, toutefois, essayé de transplanter nos cultures sur terre de bruyère; les traumatismes subis au moment du repiquage, et la moindre résistance de ces plantes, toujours cultivées en enceinte stérile, ont provoqué une nécrose encore plus rapide.

Conclusions. — 1° Nous avons obtenu, *in vitro*, le développement complet de *Pteris longifolia* à partir de jeunes embryons séparés du prothalle après l'apparition des initiales.

Les diverses étapes de la morphogénèse ont été successivement atteintes. La première feuille apparaît, suivie de la première racine normale; la plantule porte ensuite deux autres feuilles juvéniles, mais plus compliquées. Les feuilles suivantes sont de type adulte; parallèlement de nombreuses racines se développent.

Après dix mois, les feuilles ont tendance à devenir fertiles, la fausse indusie précédant de peu l'apparition des sporanges est présente.

2° Le cycle presque complet de la Fougère s'effectue en un an environ. En serres, il faut un an et demi à deux ans pour arriver au même résultat.

3° La morphogénèse du sporophyte isolé ne nécessite que des éléments simples : eau, sels minéraux, oligo-éléments et glucose; il s'agit d'un milieu liquide stagnant.

Cependant, on pourrait nous objecter que, dans nos expériences, les quelques cellules prothalliennes et archégoniales qui restent autour de l'embryon au moment de l'isolement, peuvent participer à la nutrition ou à une partie de celle-ci. Il n'en est rien, car lorsqu'on cultive des embryons entièrement extraits de l'archégone (DE MAGGIO et WETMORE, 1961), on obtient des résultats identiques. Les facteurs que nous avons précédemment mis en évidence sont donc bien ceux qui induisent la morphogénèse de l'embryon.

Discussion. — Il serait intéressant de comparer nos résultats à ceux obtenus avec les cultures d'embryons d'Angiospermes.

Actuellement, à la suite de RIJVEN (1952) et RAPPAPORT (1954), on distingue, chez les Angiospermes, les cultures d'embryons « pré-germinales » et « post-germinales ». Les premières sont effectuées à partir d'embryons séparés de l'ovule durant l'embryogénèse et encore immatures; les secondes, à partir d'embryons déjà mûrs, isolés de la graine et prêts à germer pour donner une plante viable. Chez les Fougères, nous savons qu'une fois les initiales de la première feuille et de la première racine individualisées, un milieu glucosé suffit pour aboutir au développement complet de l'embryon.

Comme on le voit, l'apport de vitamines n'est pas nécessaire. Par contre, DE MAGGIO et WETMORE (1961) rapportent que si l'on cultive des embryons isolés avant l'apparition des initiales, le milieu de culture doit contenir du lait de coco ou un mélange de sorbitol et d'inositol, pour aboutir au même résultat.

Ces observations concordent bien avec ce que les auteurs ont observé

pour les cultures pré- et post-germinales d'embryons d'Angiospermes. On a en effet constaté que lorsque les embryons d'Angiospermes sont immatures, leur culture ne s'effectue qu'en présence, soit d'une forte concentration de sucre (ZIEBUR et BRINK, 1951), soit de substances de croissance telles que le lait de coco (VAN OVERBEEK, CONKLIN et BLAKESLEE, 1941, 1942), ou d'acide nicotique (BONNER, 1938). Nous notons aussi que les cultures d'ovaires se font en milieu riche (NITSCH, 1951; MAHESHWARI and LAL, 1961). Par contre, avec les embryons mûrs, on n'emploie, généralement, que des sels minéraux et un sucre (RANDOLPH et KHAN, 1960), et, bien souvent, la concentration de ce dernier est faible (TUKEY, 1934-1938; RIETSEMA, SATINA et BLAKESLEE, 1953).

On peut donc comparer les embryons d'Angiospermes et de Ptéridophytes : il est possible de penser que la maturité, chez ces derniers, est atteinte, lorsque les initiales de la feuille et de la racine sont présentes. A ce stade, leurs besoins sont identiques à ceux de l'embryon mûr d'Angiosperme, comme il a été indiqué plus haut.

Outre cette comparaison, l'examen de nos résultats nous a permis de constater qu'il suffit d'ajouter au milieu, du glucose pour obtenir le développement complet de la plantule, et, en particulier, la formation des feuilles adultes et celle de la racine que nous n'avions pu obtenir même en présence d'auxine seule ou de vitamine.

Cette conclusion ne concorde pas avec celle de JAYASEKERA et BELL (1959). Ces derniers, en effet, pensent que « auxin diffusing from the apical meristem of gametophyte promotes differentiation in general in the embryo and development of the first root in particular ». Nous serons plus nuancée dans nos conclusions. Nous croyons plutôt que dans nos expériences, en ajoutant du glucose à nos milieux, le taux de glucide devient suffisant pour que la rhizogénèse puisse s'effectuer. Comme l'ont déjà montré nos expériences, l'auxine seule ne semble pas jouer un rôle primordial.

A la suite de ces résultats, nous pouvons comprendre pourquoi un embryon isolé sur milieu minéral gélosé ne forme une racine qu'à la base de la cinquième ou de la sixième feuille seulement (p. 30). A ce stade, les feuilles sont suffisamment nombreuses pour synthétiser, à elles seules, le taux de substances carbonées nécessaires à la rhizogénèse.

Ce n'est pas la première fois que l'on a montré l'effet favorable des sucres sur la rhizogénèse des embryons isolés, RIETSEMA, SATINA et BLAKESLEE (1953) l'avaient déjà montré chez *Datura Stramonium* et BALL (1959) chez *Ginkgo*.

Nos expériences montrent aussi les besoins différents du méristème apical des organes aériens et de la racine. Nous avons vu qu'un milieu minéral permet le développement du cotylédon et de plusieurs feuilles de type juvénile, alors que la racine ne poussera que si ce milieu minéral contient un sucre. La rhizogénèse s'effectue en milieu riche en sucre, tandis que le développement des feuilles juvéniles se

fait à partir des sels minéraux seulement. Ces différences de métabolisme entre les cellules des méristèmes apical et radiculaire ont déjà été notées chez les Angiospermes. Chez *Datura Stramonium*, par exemple, l'apex peut croître sur milieu glucosé à 0,1 ou 1 %, alors que la racine nécessite l'emploi de concentration de glucose allant jusqu'à 4 %.

Ce comportement des plantules montre, en outre, que leur apex caulinaire est plus vite autonome que le pôle opposé, plus exigeant.

De plus, il confirme la conception biochimique actuelle de la morphogénèse « *that different specific substances, or different concentration of them, may be involved in the inception of the different organs* » (WARDLAW, 1955).

7° Influence du milieu solide glucosé.

La morphogénèse normale des sporophytes isolés en milieu liquide, une fois obtenue, nous nous sommes demandé si l'emploi d'un milieu sucré solidifié ne serait pas bénéfique pour nos cultures. Nous avons

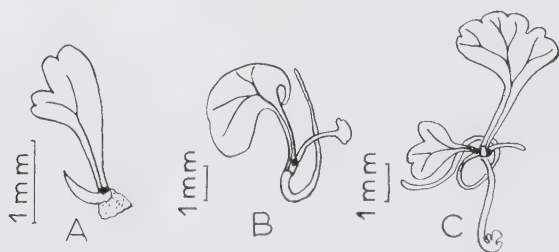


FIG. 41. — *Pteris longifolia*. Plantule de 13 jours (A); 27 jours (B); 40 jours (C), cultivées sur milieu sucré gélifié.

donc fait une nouvelle expérience en solidifiant le milieu Knop sucré à 2 %, par 1 % de la gélose préalablement lavée (voir p. 30). Les embryons ont été isolés puis placés dans le milieu dans les mêmes conditions que pour l'expérience précédente. La figure 41 montre quelques-uns des premiers stades de la morphogénèse dans ces conditions. Elle est semblable à celle obtenue en milieu liquide (fig. 36 A et B); une seule différence : le développement est plus lent; la première feuille n'apparaît, sur les milieux solides, que treize jours après l'ensemencement, et il faut plus d'un mois pour que la deuxième feuille se développe. Un peu plus tard, lorsque les premières frondes de type adulte sont apparues, il n'y a plus aucune différence entre les plantes obtenues dans nos deux sortes d'expériences, le retard qui s'était manifesté au début des cultures sur milieu solide s'est progressivement estompé.

Le milieu solide est donc un peu moins favorable que le milieu liquide.

Les mêmes phénomènes ont été notés, avec les cultures d'embryons

de *Todea* complètement isolés, par DE MAGGIO et al. (1961) : ces auteurs concluent également que les milieux solides sont moins favorables à la formation des premiers organes de l'embryon que les milieux liquides.

Nous pouvons donc tirer de cette étude comparative de l'embryogénèse de *Pteris longifolia* en milieu solide et liquide, les conclusions suivantes :

1° Les tissus du sporophyte, comme ceux du gamétophyte, supportent bien le contact prononcé avec le milieu aqueux.

2° Contrairement à ce qui a été observé (GAUTHERET, 1959) pour les cultures de tissus où le contact du milieu aqueux favorise, en général, le développement des racines, ce n'est pas ce contact qui permet, ici, l'apparition des racines de nos plantules, mais bien le glucose puisque la rhizogénèse ne s'effectue pas sans ce corps, quel que soit l'état physique du milieu.

8° Influence des sucres et des vitamines.

Afin de voir si les vitamines, normalement élaborées par le prothalle, ont une influence sur le développement, nous avons ajouté au milieu liquide sucré habituel les vitamines du groupe B, déjà utilisées avec les milieux non glucosés.

Les solutions qui ont donné les meilleurs résultats sont les suivantes :

K + N + thiamine 10^{-6} + glucose 2 %.

K + N + biotine 10^{-8} + glucose 2 %.

K + N + inositol 10^{-4} + glucose 2 %.

K + N + thiamine 10^{-6} + biotine 10^{-8} + inositol 10^{-4} + glucose 2 %.

Avant de décrire nos observations, examinons le tableau III :

TABLEAU III. — RÔLE DU GLUCOSE ET DES VITAMINES

MILIEU UTILISÉ	K + N +				
	Glucose 2 %	Glucose 2 % + Thiamine 10^{-6}	Glucose 2 % + Biotine 10^{-8}	Glucose 2 % + Méso- inositol 10^{-4}	Glucose 2 % + Thiamine 10^{-6} + Biotine 10^{-8} + Méso- inositol 10^{-4}
Délai d'apparition de la 1 ^{re} feuille et de la 1 ^{re} racine	7 jours.	15 jours.	7 jours.	10 jours.	8 à 10 jours.
Délai d'apparition de la 2 ^e feuille	15 jours.	1 mois.	15 jours.	15 à 20 jours.	15 à 20 jours.
Formation de racines et de frondes adultes .	+	+	+	+	+
Formation de sporanges .	0	0	0	0	0

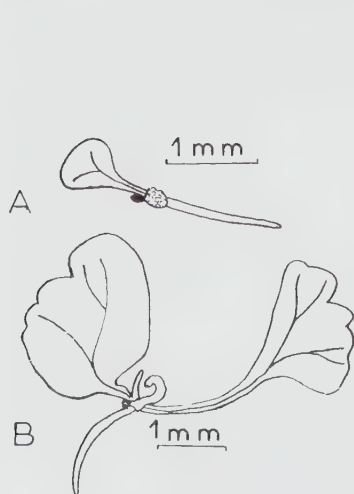


FIG. 42.

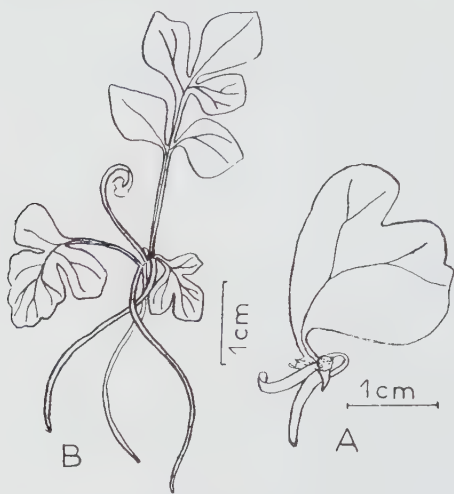


FIG. 44.

FIG. 42. — *Pteris longifolia*. Plantules de 15 jours (A) et 1 mois (B) cultivées en milieu liquide sucré additionné de 10^{-6} g/l de thiamine.

FIG. 44. — *Pteris longifolia*. Plante de 20 jours (A) et 45 jours (B) cultivées en liquide sucré additionné de biotine (10^{-8} g/litre).



FIG. 43. — Plante de 3 mois cultivée sur le même milieu que précédemment.

Lorsqu'il s'agit de thiamine, le développement est identique à celui obtenu avec les milieux glucosés seulement (fig. 42 A et B).

Peut-être même, est-il plus rapide dans ce dernier. En effet, en présence de thiamine, les plantules n'ont une feuille et une racine, qu'au bout de quinze jours (fig. 42 A), et il faut attendre un mois pour que la deuxième feuille se développe (fig. 42 B). Par contre, en milieu glucosé seulement, ce stade est atteint en deux semaines (fig. 36 B). On comparera aussi les figures 38 et 43. Toutes deux correspondent à des plantules de trois mois. Celles cultivées sur thiamine (fig. 43) sont nettement moins hautes, leur aspect est plus grêle; qui plus est, le nombre de paires de folioles par fronde est inférieur d'une ou deux paires dans le milieu vitaminé.

Malgré ces différences, qui s'estompent d'ailleurs après six ou sept mois de culture lorsque les plantes possèdent des feuilles adultes, nous noterons, dans les deux cas, un développement identique des racines et

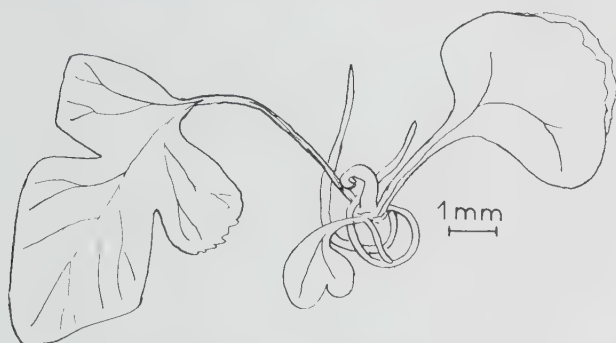


FIG. 45. — *Pteris longifolia*.
Plante de 1 mois cultivée en présence de 10^{-4} g/l de méso-inositol.



A



B

FIG. 46. — *Pteris longifolia*. Plante de 3 mois (A) et 1 an (B),
cultivées sur le même milieu que précédemment.

des frondes adultes que nous n'avions pu obtenir en milieu non glucosé.

L'addition de biotine sera-t-elle plus bénéfique que celle de thiamine ? Comme précédemment, les feuilles et les racines apparaissent (fig. 44 A). Dès la troisième feuille, le type adulte est atteint (fig. 44 B). Sur ce milieu, la croissance est aussi rapide que sur glucose. Le déve-

loppement se poursuit, et nous obtenons très rapidement le même type de plantules.

Bien que le retard noté pour la thiamine ne se retrouve pas ici, nous ne pouvons conclure à une action bénéfique de la biotine, puisqu'il n'y a pas de différence entre les plantes obtenues sur ce milieu et celles sur glucose.

L'adjonction de méso-inositol ne provoque pas, non plus, une accélération de la croissance (fig. 45; fig. 46 A et B).

Après neuf mois de culture, plus rien ne différencie les plantes cul-

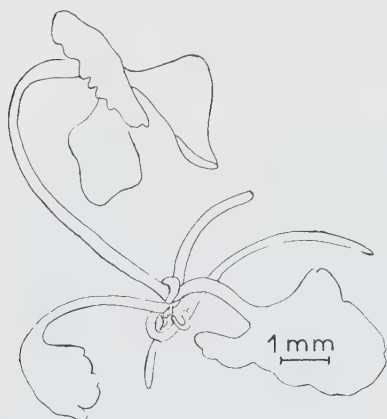


FIG. 47. — *Pteris longifolia*. Plante de 45 jours, cultivée sur liquide sucré additionné du mélange de vitamines du groupe B; thiamine, biotine, inositol.



FIG. 48. — *Pteris longifolia*. La même après 3 mois de culture.

FIG. 48.

livées sur milieux glucosés seulement, de celles cultivées en présence de méso-inositol.

Quelle que soit la vitamine utilisée, il n'y a jamais formation de sporanges; tout au plus, comme dans le cas des milieux non vitaminés, note-t-on la formation de la fausse indusie.

Examinons maintenant ce que l'on obtient avec un mélange de vitamines : en fait, la vitesse de développement est sensiblement équivalente. Trois feuilles se sont formées (fig. 47) après un mois et demi de culture; la troisième est déjà trilobée, précédant l'avènement des feuilles de forme adulte. Après trois mois de culture (fig. 48), nous constatons que l'action du mélange de vitamines a essentiellement porté sur la surface foliaire et sur la longueur du

rachis entre chaque paire de folioles. Plus tard, vers un an, quand la fausse indusie se forme, il n'est plus de différence visible entre ces plantes et celles cultivées dans d'autres conditions.

Nous avons donc vu que l'adjonction de vitamines à nos milieux de culture n'améliore pas sensiblement la morphogénèse du sporophyte isolé de *Pteris longifolia*. Nous pensons que dans les conditions naturelles, une fois atteint le stade feuilles adultes, la plante est capable d'élaborer, elle-même, toutes les substances qui lui sont nécessaires.

9° Discussion et conclusions :

RÔLE DU PROTHALLE DANS L'EMBRYOGÉNÈSE ET LE DÉVELOPPEMENT ULTÉRIEUR DU SPOROPHYTE

Après avoir mis en évidence quelques-uns des facteurs déclenchant les étapes normales de la morphogénèse des sporophytes isolés, nous allons maintenant essayer de dégager quelle est la participation du prothalle à ces phénomènes lorsque le sporophyte se développe normalement sur celui-ci.

Afin de résumer aussi complètement que possible le rôle du gamétophyte à tous les stades du développement de la plante, du zygote à la plante adulte, nous ferons le point sur la question en discutant l'ensemble des résultats publiés actuellement par différents auteurs, notamment par DE MAGGIO et WETMORE (1961) qui ont cultivé des embryons isolés de *Todea* à différents stades de leur développement (zygote, embryons pluricellulaires pourvus ou dépourvus de leurs initiales).

A. — Prothalle et zygote

On sait que la plantule se développe sur le prothalle en hétérotrophe. Le rôle du prothalle est donc essentiellement nutritif.

Pour WARDLAW (1955), il s'agirait de l'action de facteurs biochimiques. Il y aurait, dès les plus jeunes stades, transfert de matériaux nutritifs élaborés par les tissus photosynthétiques environnants, à partir des sels minéraux du sol ou du milieu nutritif, vers le zygote, par l'intermédiaire des parois archégoniales.

On pense actuellement que l'établissement de la polarité et le premier clivage du zygote sont du ressort du prothalle.

Différents auteurs pensent, en effet, que la polarité et, par voie de conséquence, les premiers clivages des embryons de *Leptosporangiiées*, sont induits, à un instant donné de la vie du zygote, soit par les parois archégoniales (CHAMPAGNAT, 1961), soit (WARDLAW, 1955) par des gradients biochimiques internes.

Les dernières expériences de DE MAGGIO et WETMORE (1961, 1963)

feraient pencher la balance en faveur de la première hypothèse : en effet, ces auteurs indiquent que les cultures des zygotes isolés aboutissent à la formation de structures thalloïdes, quel que soit le milieu utilisé, et pensent que « *the characteristic proliferating, undirected, growth pattern of these young isolated embryos strongly indicates that it is not so much a nutritional requirement which is lacking, as it is a physical requirement, i. e., surrounding cells* ».

Si cette hypothèse est exacte, on en reviendrait ainsi aux interprétations des premiers auteurs sur le rôle des facteurs externes au sporophyte sur l'apparition des premières cloisons (SADEBECK, 1879, 1878; HEINRICHER, 1888; et en particulier LANG, 1909).

Il est possible, aussi, que les deux facteurs aient pu jouer, c'est l'opinion de JAYASEKERA et BELL (1959) qui, outre les facteurs physiques, évoquent, pour l'induction de la polarité, le gradient de répartition d'auxine (ALBAUM, 1938) à partir de l'apex du prothalle.

Quoi qu'il en soit, on voit tout de même le rôle primordial du prothalle à ce stade du développement de l'embryon.

B. — Prothalle et embryon sans initiale

Il semble, d'après les expériences de DE MAGGIO et *al.* (*loc. cit.*), que lorsqu'on cultive l'embryon isolé juste avant que les initiales de la feuille et de la racine ne se soient individualisées, on ne puisse obtenir un sporophyte complet que si l'on ajoute, au milieu minéral sucré, du lait de coco ou un mélange de sorbitol et d'inositol. Il est donc logique de conclure de ces expériences que, normalement, le prothalle fournit à l'embryon, une fois les octants formés, outre les matériaux nécessaires à la croissance, une ou plusieurs substances spéciales, indispensables à la différenciation des initiales de la racine et de la feuille. L'effet de cette ou de ces substances peut être remplacé par du lait de coco, dont on connaît les propriétés stimulantes dans la multiplication cellulaire, ou un mélange de sorbitol et d'inositol.

Comme nous le verrons, lorsque les initiales se sont formées, cette substance n'est plus nécessaire, ou bien, si elle l'est, l'embryon est capable de la synthétiser lui-même.

C. — Prothalle et embryon différencié

Au cours de nos recherches, nous avons vu qu'un embryon isolé, une fois les initiales de la tige et de la racine formées, se développe en une plantule uniquement pourvue de feuilles de type juvénile et sans racine, quand on le cultive sur un milieu composé, de sels minéraux et d'oligo-éléments : le métabolisme de la partie apicale, provenant de l'hémisphère épibasale, est donc différent de celui de la partie distale, issue de la division de la moitié hypobasale.

Peut-être faut-il voir là une conséquence de la polarité qui aurait déterminé des différences entre les cellules issues des deux pôles opposés du zygote. Ce serait là une « division différentielle », c'est-à-dire, « une division donnant naissance à deux cellules filles qui se distinguent l'une de l'autre » (Lück, 1962).

Lorsque l'embryon possède déjà des initiales, le rôle du prothalle se réduit donc à fournir à la partie apicale, des éléments minéraux à partir desquels cette partie de l'embryon est capable d'élaborer toutes les autres substances de son métabolisme; par contre, pour que la première racine se développe, le prothalle synthétise, à son profit, des glucides sans lesquels il ne peut y avoir de rhizogénèse.

D. — Prothalle et développement de la plantule

Lorsqu'une plantule a une feuille et une racine, on pourrait penser que le rôle du prothalle est maintenant terminé; en réalité, le sporophyte n'est pas encore suffisamment développé pour assurer sa croissance ultérieure. A ce moment, le prothalle lui fournit encore le surcroît de matière nutritive nécessaire à la formation des feuilles de forme adulte : en effet, nous avons montré que lorsque les plantules sont isolées, l'apparition des feuilles de ce type ne peut se faire qu'en présence de glucides.

Ceci confirme l'opinion de GEBEL (1908), selon laquelle il y aurait une relation entre nutrition et forme de feuille, les unes étant plus simples que les autres parce qu'elles ne bénéficieraient pas d'un apport nutritif suffisant. Cet apport de matière nutritive nécessaire à l'apparition des feuilles complexes a déjà été mis en évidence par ALLSOPP (1951, 1952, 1953), WETMORE et WARDLAW (1951), WARDLAW (1952) et SOSSOUNTZOV L. (1958).

C'est au moment où le sporophyte possède une ou deux feuilles adultes qu'il cesse d'avoir recours au prothalle. Celui-ci a alors tendance à disparaître, d'autant plus qu'il est soumis depuis le début de l'apparition des feuilles à l'influence inhibitrice de la jeune plantule (ALBAUM, 1938, voir fig. 5, p. 15). Le sporophyte subit, ensuite, les conditions habituelles à tout développement; il est soumis aux facteurs externes (physiques, chimiques et biologiques) et aux facteurs internes corrélatifs. Lorsque l'équilibre de cet organisme est tant soit peu rompu, des aberrations du développement se produisent, elles feront l'objet de notre prochain chapitre.

Conclusions. — L'ensemble des données que nous venons d'exposer nous amènent à énoncer les conclusions suivantes sur l'influence du gamétophyte dans l'embryogénèse : il participe essentiellement à la nutrition de l'embryon; son action diminue de plus en plus au fur et à mesure que se développe le sporophyte.

Outre son rôle nutritif, on peut penser qu'il a diverses propriétés inductives à plusieurs stades de l'embryogénèse :

1° La polarité et le premier clivage du zygote sont de son ressort : la polarité serait induite, d'après les recherches récentes sur ce sujet, soit par l'action physique produite par les cellules archégoniales sur leur contenu (DE MAGGIO, *loc. cit.*), soit par le gradient de répartition d'auxine du prothalle (JAYASEKERA et BELL, 1959).

2° Avant l'apparition des cellules initiales de la feuille et de la racine, le prothalle est probablement le producteur d'une substance dont l'action est nécessaire à l'individualisation des initiales des organes de la jeune plantule (DE MAGGIO, *loc. cit.*).

3° Une fois les initiales formées, nous avons pu établir que le prothalle fournit, à la partie apicale du sporophyte, les éléments simples qui peuvent être remplacés, lorsqu'on cultive séparément l'embryon, par des sels minéraux et des oligo-éléments, ce qui permet le développement de feuilles de forme juvénile, tandis qu'il assure, par sa fonction photosynthétique, la quantité de sucre nécessaire à la croissance de la racine.

4° C'est le supplément de matière nutritive qu'il synthétise qui conditionne aussi l'apparition des feuilles adultes.

CHAPITRE II

ÉTUDE COMPARATIVE DES CULTURES IN VITRO DES ORGANES DE LA JEUNE PLANTULE : LA RÉGÉNÉRATION CHEZ LE SPOROPHYTE

Il est, en général, facile de reconnaître les trois organes fondamentaux chez les Phanérogames, la tige, la racine et la feuille. Mais, chez les Cryptogames vasculaires, on a constaté depuis longtemps, sans pouvoir l'expliquer (LACHMANN, 1889; PITOT, 1944, etc.), que cette différenciation entre trois types d'organes était toute relative.

EMBERGER a pu interpréter ce fait par la paléontologie, mais nous avons voulu rechercher si l'étude de la jeune plantule de Fougère, dont les tissus sont moins différenciés que chez l'adulte, ne pourrait pas contribuer à comprendre la nature morphologique de ces organes et si elle confirmerait les déductions paléobotaniques. Il était également indiqué d'essayer d'éclaircir la valeur morphologique du pied, qui physiologiquement est un suçoir. Divers auteurs s'en étaient préoccupés avant nous. HOFMEISTER (1851) le considérait comme un axe primaire avorté, CHAUVEAUD (1921) comme une « phylle transformée », BOWER (1922) comme un « organe adaptatif ».

Pour résoudre ces problèmes, nous avons cultivé chacune des quatre parties de la jeune plantule isolément, la première feuille, la première racine, le pied et le point végétatif.

Nous avons pensé, en outre, que l'absence de corrélations inhibitrices entre ces diverses parties, lorsqu'on les cultive isolément, permettrait de mettre en évidence un élément supplémentaire de la morphogénèse de la jeune plantule.

Enfin, on connaît le grand pouvoir de régénération des Fougères, on sait qu'en cultivant de jeunes feuilles ou de jeunes racines, on obtient parfois, outre des prothalles, une régénération de bourgeons.

Or, c'est en empêchant la régénération de ces bourgeons, pour ne laisser subsister qu'une multiplication cellulaire anarchique, que MOREL (1950, 1956) a essayé d'aboutir à une véritable culture de tissus de Ptéridophytes : mais ces cultures ont finalement toujours donné des organes. Peut-être réussirons-nous à obtenir avec *Pteris longifolia* une culture de tissus de sporophyte.

A. — OBSERVATIONS AVEC LE POINT VÉGÉTATIF

L'un des premiers organes que nous ayons cultivé est le point végétatif de la tige, issu comme la première feuille de l'hémisphère épibasal.

A partir d'une plantule cultivée sur un prothalle dans des conditions aseptiques, et dont la première feuille et la première racine sont bien développées, on isole, stérilement, le point végétatif qui se trouve à la base du cotylédon; puis, on le transporte sur le liquide de Knop additionné des oligo-éléments de Berthelot et de 2 % de glucose.

Vingt jours après la mise en culture, une fronde, de forme plus simple que celle qu'aurait dû avoir la deuxième feuille s'est développée;



FIG. 49.

Plantule de *Pt. longifolia*, régénérée à partir du méristème apical de la tige isolé, et cultivée sur milieu de Knop, oligo-éléments et 2 % de glucose.

la racine suit, et une nouvelle plante s'édifie bientôt normalement. Un léger retard cependant est constant; il faut attendre la sixième feuille pour arriver au stade adulte. Au bout de deux mois (fig. 49), les plantes sont tout à fait identiques à celles développées dans les conditions naturelles.

Ces résultats, obtenus à partir de cultures d'apex de plantules, ne sont pas surprenants, car MOREL (1950) en avait déjà obtenus d'identiques avec l'apex du rhizome d'*Osmunda cinnamomea*.

Nos expériences ne sont pas sans rappeler celles de BALL (1946, 1950). Cet auteur obtenait la régénération de plantes entières à partir du méristème apical de *Lupinus albus* et *Tropeolum majus* et il a démontré l'indépendance du méristème apical vis-à-vis des tissus sous-jacents et sa nature « *self-determining* ».

B. — OBSERVATIONS AVEC LA PREMIÈRE FEUILLE

De très nombreux chercheurs ont observé, qu'en cultivant isolément les premières feuilles des plantules de Fougère, elles produisent, le plus souvent à leur surface, des formations prothalliennes par aposporie (GEBEL, 1908). Parfois, les feuilles sont capables de régénérer

des bourgeons sporophytiques (LAWTON, 1932; MC VEIGH, 1937; HUREL-PY, 1950).

Nous avons utilisé, comme milieu de culture, le liquide de Knop additionné de 0,5 cm³ par litre d'oligo-éléments. La première feuille de plantules obtenues aseptiquement sur des prothalles a été sectionnée au-dessus du point végétatif, puis transportée sur le milieu sus-indiqué.

Nous avons constaté, après un mois de culture (fig. 50), la formation de prothalles aposporiques sur le limbe ou le pétiole de la feuille. Par ailleurs, il arrive parfois (fig. 51) qu'à la surface du limbe ou du pétiole, généralement sur la face dorsale des feuilles, il y ait formation de bourgeons sporophytiques.

Ces bourgeons néo-formés se développent, mais, après trois mois, ils n'avaient pas encore de racines; de même, les feuilles produites étaient de type juvénile.

Afin d'obtenir des régénérations tout à fait normales, nous avons pensé à ajouter à notre milieu de culture du glucose, puisque nous avons constaté que ce sucre permettait la rhizogénèse chez les embryons isolés séparés du prothalle.

Nous avons pu observer (fig. 52), sur le pétiole de feuilles isolées ensemencées en milieu glucosé, qu'une jeune plantule normale prenait

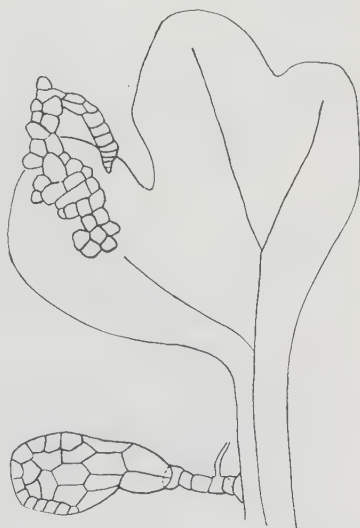


FIG. 50. — Formations prothalliennes aposporiques sur les feuilles isolées de plantules de *Pt. longifolia*.



FIG. 51. — Régénération de bourgeons sporophytiques sur les feuilles isolées de plantules de *Pt. longifolia*, cultivées 3 mois sur milieu de Knop additionné d'oligo-éléments; il n'y a pas encore de racines.

naissance, un mois et demi après l'ensemencement. Son système racinaire se développait normalement, et la troisième feuille était déjà trilobée, constituant ainsi une forme de passage aux feuilles de type adulte.

Il est donc possible de tirer de ces expériences les conclusions suivantes :

1° Les tissus foliaires déjà organisés peuvent produire des structures thalloïdes analogues aux tissus prothalliens haploïdes.



FIG. 52. — Régénération d'une plantule complète sur un pétiole de feuille isolée, cultivée 1 mois 1/2 sur milieu de Knop glucosé.

2° Ces tissus foliaires sont capables de redonner naissance à une plante entière.

3° Pour qu'il y ait régénération de plantules normales, en particulier, pour que s'effectue la rhizogénèse, un milieu sucré est indispensable. Nous retrouvons là ce que nous avons vu pour les embryons isolés.

Le développement des feuilles juvéniles peut se faire sans sucre, tandis que celui des feuilles adultes et des racines demande un apport nutritif plus important.

4° La première feuille, issue comme l'apex de la tige, de la partie épibasale de l'œuf, régénère, lorsqu'on la sépare de la plante et qu'on la cultive isolément, de la même manière que l'apex de la plantule (voir p. 57). Dans les deux cas, la régénération se fait d'emblée, sans qu'il y ait passage par une phase de cal parenchymateux.

Nous rapprocherons aussi ce mode de régénération de ce qu'a observé STEEVES (1961). Cet auteur a, en effet, pu montrer qu'un primordium de feuille isolé du rhizome (*Osmunda cinnamomea*), est capable pendant un temps très court de donner naissance à une plante entière. Lorsqu'il pratique l'isolement plus tardivement, la feuille est déjà déterminée et effectue son développement normal.

Par contre, comme nous l'avons vu, les cellules de la première feuille ne perdent jamais le pouvoir de retrouver les totipotentialités embryonnaires, elles sont capables de donner naissance à une plantule.

C. — LE PIED EN CULTURE

Outre les cultures de point végétatif de tige et de première feuille, nous avons effectué celles de suçoir ou pied de la plantule.

Pour cela, nous avons utilisé des prothalles porteurs de plantules munies de leur première feuille et de leur première racine, obtenues

aseptiquement à partir de la spore. À l'aide de microscalpels, on sectionne au ras du prothalle, la première feuille, le point végétatif et la racine, suivant une ligne A B (fig. 53). Le plus souvent, seules les cellules du sucoir restent en place; parfois, elles sont arrachées en même temps que les autres parties de la plantule, ces prothalles sont alors rejetés. Parfois, encore, des tronçons du faisceau vasculaire interne (FV, fig. 53) restent attachés aux tissus sous-jacents; ils apparaissent à la loupe binoculaire, sous forme de lignes brillantes; il suffit, alors, de les enlever avec une aiguille stérile.

Ces prothalles, uniquement porteurs du pied des plantules, sont transportés sur le milieu de Knop enrichi d'oligo-éléments et non sucré.

Plusieurs phénomènes peuvent alors se produire.

Si les cellules du sucoir ont été par trop lésées au moment de la section de la plantule, elles se nécrosent et l'emplacement de la blessure brunît. Le prothalle continue son développement; de nouveaux archégones sont fécondés, et une nouvelle plantule prend naissance normalement.

Lorsque la section de la jeune plantule n'a pas blessé trop profondément les cellules du pied, il se forme, au niveau de la blessure, après quinze jours à un mois de culture, une masse charnue recouverte d'une pellicule de cellules superficielles nécrosées, faisant saillie à l'extérieur du prothalle (fig. 54 A). Cette masse grossit, se boursouffle, et, un mois plus tard, de petits bourgeons crèvent l'enveloppe nécrosée (fig. 54 B). Le développement de ces bourgeons donne naissance à des plantules normales (fig. 54 C).

Nous nous sommes demandé comment se déroulait l'histogénèse du cal qui a pris naissance à l'emplacement du pied. Pour cela, des coupes en série ont été faites, à différents stades de développement.

Les cellules du sucoir, après l'enlèvement des autres organes de la plantule, constituent un parenchyme sans vascularisation. Elles sont allongées, leur noyau est réduit (fig. 55). Ces cellules sont en contact étroit avec les tissus prothalliens environnants. Au début de la prolifération, les cellules internes de ce parenchyme se divisent activement, tandis que celles de la surface, traumatisées, voient leurs parois s'épaissir. À la suite des divisions successives, le parenchyme primitif se transforme en un parenchyme méristématique dont les cellules, petites, sont isodiamétriques à cytoplasme dense, et à vacuole réduite (fig. 56).

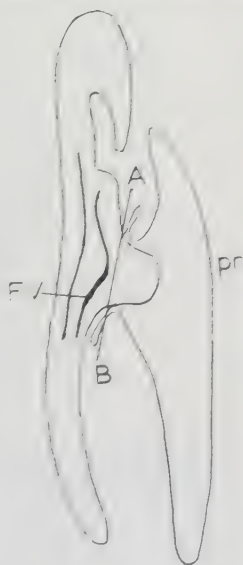


FIG. 53. — Schéma montrant comment se fait l'isolement du pied de la jeune plantule.

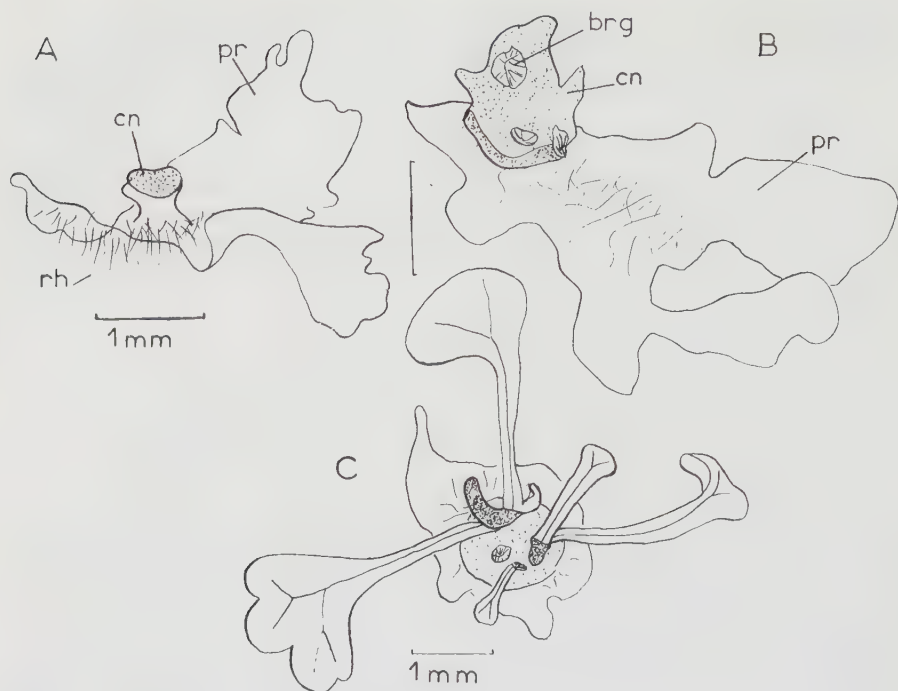


FIG. 54. — Le pied-suçoir en culture. A, un mois après l'isolement; B, 2 mois 1/2; C, plantules régénérées sur le cal parenchymateux développé à la place du pied (cn, cellules nécrosées; brg, bourgeons; pr, prothalle).

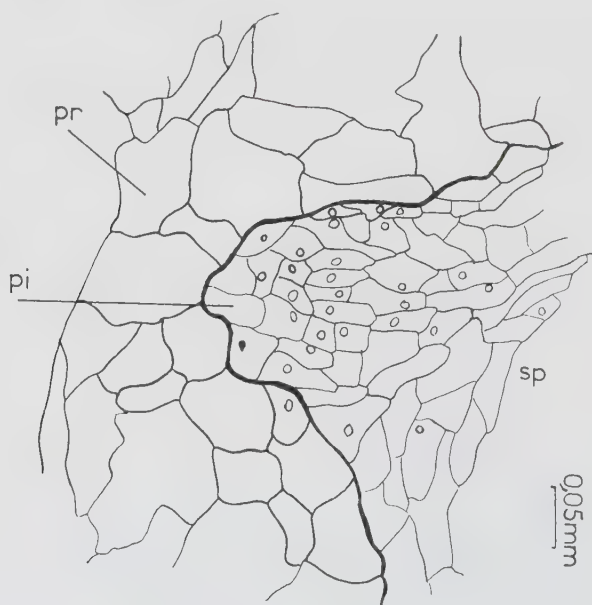


FIG. 55. — Cellules du pied juste après la section de la plantule. Il s'agit d'un parenchyme indifférencié (pr, prothalle; pi, pied; sp, sporophyte sectionné).



FIG. 56. — Début de la prolifération des cellules du pied.
Le parenchyme est méristématique
(cn, cellules nécrosées; pr, prothalle).

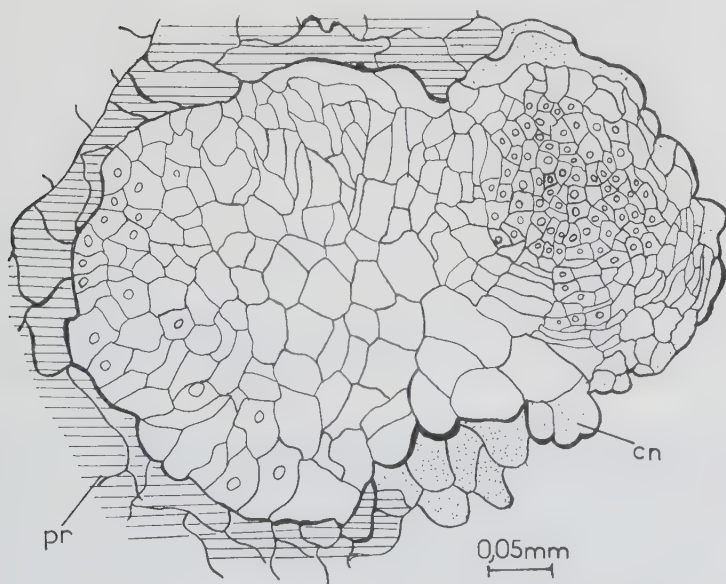


FIG. 57. — Prolifération du pied à un stade plus avancé que le précédent.

Plus tard (fig. 57), ce parenchyme donne, du côté de la blessure, une nouvelle zone méristématique qui grossit, mais qui a tendance à s'organiser. C'est cette protubérance parenchymateuse qui fait saillie à l'extérieur du prothalle. Parallèlement, les cellules internes du paren-

chyme, entourées par le prothalle, se bourrent d'amidon. La protubérance méristématique se transforme en une masse parenchymateuse, dont certaines cellules se différencient en trachéides (fig. 58). A l'intérieur des couches cellulaires plus ou moins nécrosées qui entourent cette masse, on voit se former quelques massifs de petites cellules qui s'organiseront pour donner les méristèmes de nouveaux bourgeons

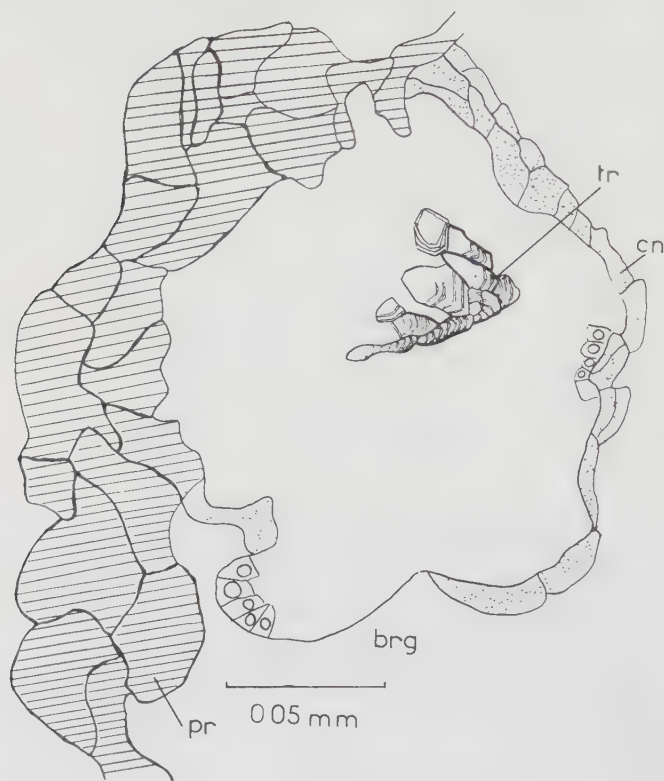


FIG. 58. — Le cal du pied au moment de la formation des bourgeons (*brg*); des trachéides (*tr*) se sont différenciées dans le parenchyme.

sporophytiques. Lorsqu'ils sont suffisamment développés, ils crèvent l'enveloppe extérieure et font saillie à la surface du cal.

Cette prolifération n'est pas sans rappeler la manière dont s'effectue celle des colonies tissulaires. Ne serait-il pas possible, alors, de cultiver isolément ce cal, pour aboutir à une véritable culture de tissu de sporophyte ?

Dans ce but, nous avons laissé proliférer durant quinze jours des cellules du suçoir comme il a été fait précédemment. La culture était arrivée à un stade où le parenchyme méristématique (fig. 56) était formé. Nous avons alors isolé complètement les tissus régénérés de l'enveloppe prothallienne.

Afin de remplacer l'influence du prothalle, nous avons repiqué l'explantat dans une solution de Knop glucosée à 2 %.

Un mois plus tard, un cal d'un demi-centimètre, jaunâtre, s'était formé, nous l'avons repiqué à nouveau après l'avoir divisé en deux parties.

Très rapidement, des bourgeons se sont formés. Nous avons recommencé les expériences en essayant de bloquer la formation de ces bourgeons par addition au milieu d'acide naphthalène-acétique. Malgré cela, nous n'avons pas empêché le bourgeonnement (fig. 59).

De ces expériences, plusieurs conclusions se dégagent clairement :

1° Les cellules du pied, comme celles de la feuille ou du point végétatif, sont capables de donner naissance à des plantules normales.

2° Les débuts de la prolifération du suçoir conduisent à une culture très analogue à celles des tissus d'Angiospermes. La masse parenchymateuse homogène qui se développe comporte une vascularisation ligneuse sous forme de trachéides, puis des bourgeons sporophytiques endogènes.

Nous essayerons par la suite de maintenir la culture sous forme parenchymateuse; jusqu'à présent nos efforts ont été vains. Malgré tous nos essais, nous n'avons pu obtenir, même avec plusieurs repiquages, une culture de tissus au sens de GAUTHERET (1959); toujours, après un certain temps de développement anarchique, il y a eu apparition de bourgeons.

3° Comme c'est le cas habituellement lorsqu'on isole des fragments végétaux, la séparation du pied, du restant de la plantule, a eu pour effet de soustraire ses cellules à l'action inhibitrice qu'elles subissaient au sein du sporophyte, ce qui a provoqué leur prolifération en une protubérance parenchymateuse.

Cette protubérance n'est pas sans rappeler celle obtenue par WARD et WETMORE (1954).

Ces auteurs en effet ont partiellement libéré des embryons, en découpant le col archégonial et en écartant les parois latérales de l'archégone de leur contenu. Le jeune embryon, qui n'était plus alors en relation avec le prothalle que par l'intermédiaire de sa partie supérieure (celle qui devait donner le pied), évoluait en une structure semblable à notre protubérance et porteuse de plusieurs bourgeons sporophytiques.



FIG. 59. — Cal obtenu à partir des cellules du pied entièrement isolées du prothalle.

D. — RÉGÉNÉRATION DE LA PREMIÈRE RACINE

Le quatrième organe de la plantule issu comme le pied de la partie hypobasale de l'œuf, la première racine, a été, lui aussi, mis en culture. Les racines de jeunes sporophytes, obtenues aseptiquement sur des prothalles, ont été sectionnées sous la loupe binoculaire, puis transportées sur le milieu de Knop glucosé. Elles mesuraient environ 1 mm de longueur. Les cultures ont été placées sous l'habituel éclairciment de douze heures par jour.

Nous avons observé ce qui suit : après quelques jours de culture, généralement dix, l'extrémité apicale de la racine commence à s'enfler en une masse dense et opaque, tandis que l'extrémité blessée se

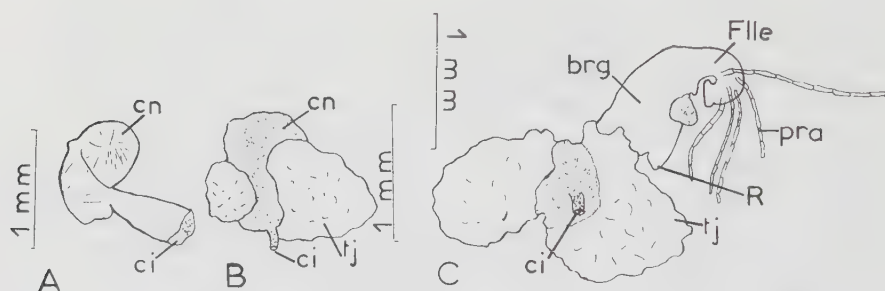


FIG. 60. — Formation du cal apical sur une racine isolée cultivée en milieu de Knop additionné d'oligo-éléments et glucosé. A, 1 mois après la section; B, 2 mois après; C, 2 mois 1/2 (cn, cellules nécrosées; tj, tissu jaune; ci, cicatrice de section; brg, bourgeons; Flle, feuille; R, racine; pra, prothalles aposporiques).

nécrose sans la moindre prolifération (fig. 60 A). Toute la racine est recouverte d'une pellicule brune de cellules nécrosées. Afin d'essayer de maintenir la prolifération du cal apical, les racines ont été repiquées, au bout d'un mois de culture, dans un nouveau milieu sucré, auquel nous avons ajouté diverses quantités de lait de coco et d'acide nicotinique.

Le milieu qui a donné les meilleurs résultats contenait 15 % de lait de coco et 5.10^{-5} g/l d'acide nicotinique.

Dans ces cas, deux mois après la section de la racine (fig. 60 B), le cal apical a encore grossi. Des boursoufflures d'un tissu jaune ont percé l'enveloppe nécrosée, tandis que la partie basale de la racine, entièrement mortifiée et brune, a tendance à s'effriter à la moindre manipulation.

Après deux mois et demi, à la surface du tissu jaune, on voit apparaître des bourgeons verdâtres dont certains se développent en sporophytes complets normalement constitués (fig. 60 C).

Ces sporophytes portent parfois quelques filaments de cellules étroites et vertes, qui sont probablement des prothalles aposporiques.

Sur des coupes faites à différents stades, on peut suivre le processus des formations apicales.

On sait que normalement, le développement de la racine des Fougères est conditionné par le fonctionnement d'une cellule apicale tétraédrique qui découpe, parallèlement à chacune de ses faces, des segments; les segments externes donnent la coiffe, tandis que les internes donnent naissance à l'écorce et au cylindre central (fig. 61).

Une semaine environ après la mise en culture de racines isolées, il n'est déjà plus possible de reconnaître le méristème radiculaire. En particulier, l'apicale tétraédrique a disparu. A sa place, et à celle des massifs sous-apicaux réguliers, qui permettaient l'élargissement de la racine, on trouve un parenchyme à gros noyaux (fig. 62) qui se développera en deux foyers histogènes (fig. 63).

Recouvrant les foyers histogènes, on reconnaît les cellules qui devaient donner la coiffe de la racine (C. fig. 62 et C. fig. 63). On peut donc en conclure que c'est surtout la région subterminale, située directement

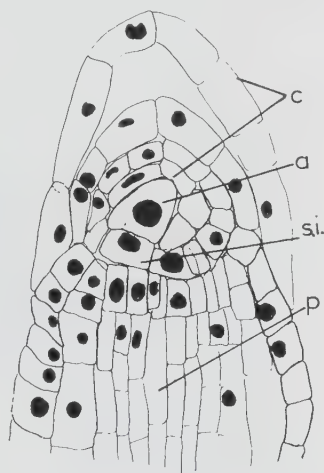


FIG. 61. — Coupe longitudinale de la partie apicale d'une racine de *Pt. longifolia* (a, apicale; c, coiffe; p, procambium; si, segments internes).

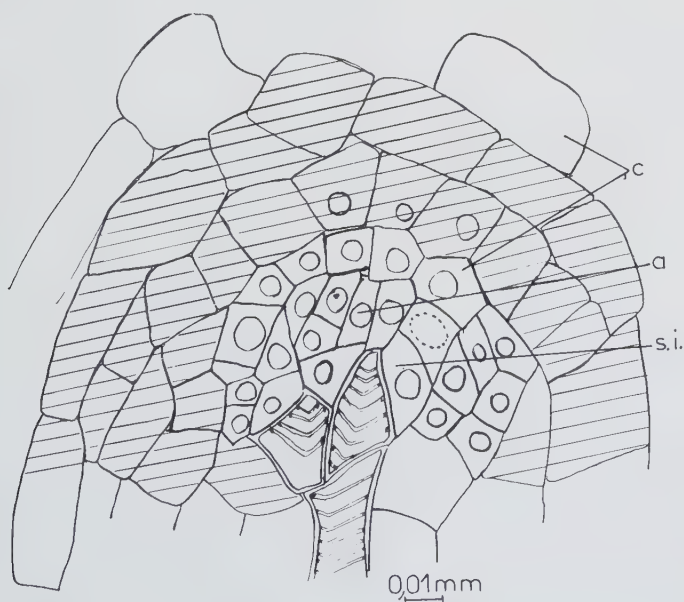


FIG. 62. — Coupe de la racine 7 jours après sa mise en culture (si, segments internes; c, coiffe; a, emplacement de l'apicale).

sous la coiffe, qui a assuré la formation des foyers histogènes.

Il semble bien que l'apicale elle-même y ait participé, mais elle ne se distingue plus des autres cellules et participe au même titre que celles-ci à l'histogénèse. Nous remarquerons aussi que les cellules

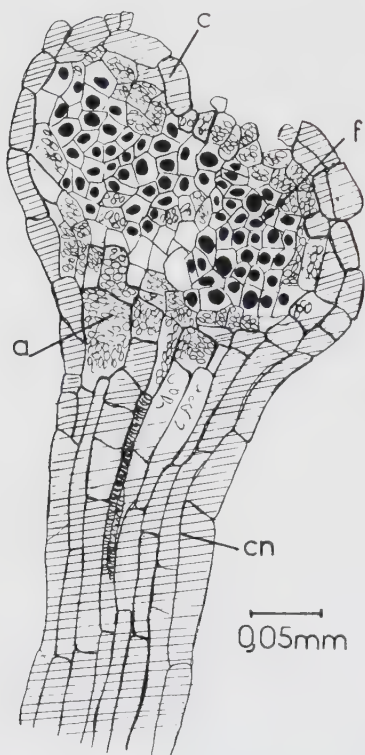


FIG. 63. — Coupe d'un cal apical âgé de 1 mois. Il s'est formé 2 foyers histogènes méristématiques (*f*), entourés de cellules nécrosées (*c*), (*a*, amidon).

sous-apicales, qui assuraient, dans les conditions normales, la croissance de la racine surtout en épaisseur, ont également perdu la possibilité de se diviser normalement; les divisions, maintenant, sont anarchiques et donnent naissance à des masses méristématiques formées de petites cellules à gros noyaux sans différenciation histologique (fig. 63). Ces tissus sont entièrement entourés d'une couche de cellules pleines d'amidon et de cellules nécrosées, qui sont : les cellules de la coiffe, la couche cellulaire externe entourant la racine, et les cellules de la partie basale de la racine située du côté de la section.

Après le repiquage, les tissus du cal sont constitués de deux grosses masses parenchymateuses homogènes (fig. 64), dans lesquelles on peut distinguer quelques trachéides réticulées. Plus tard, à l'intérieur même des tissus, mais près de leur surface, se forment de nouveaux méristèmes (*M*, fig. 65); ceux-ci donneront des bourgeons. Comme on peut le constater, leur vascularisation a tendance à se relier à celle du cal, qui lui-même forme de nouvelles trachéides en direction des bourgeons.

Afin de vérifier si des racines de Fougères plus âgées conservaient la possibilité de donner de tels cals en culture, nous avons sectionné des racines longues de 0,5 cm. Comme on le voit (fig. 66), elles n'ont jamais donné de proliférations, seuls quelques prothalles aposporiques prennent naissance à leur surface.

Après s'être quelque peu allongées, elles se nécrosent et meurent rapidement.

En résumé. — La première racine de Fougères isolée très jeune et mise en culture donne naissance à sa partie apicale à un cal. La culture de ce cal s'apparente en de nombreux points à une véritable cul-

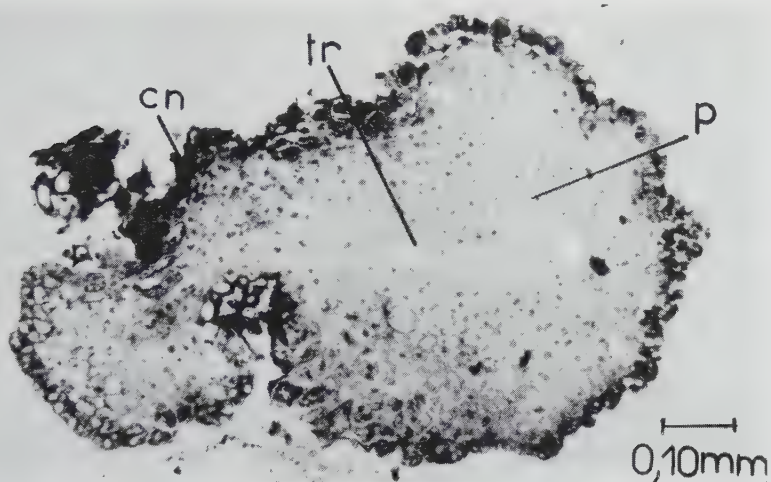


FIG. 64. — Coupe transversale d'un cal apical effectuée plus tardivement (*tr*, trachéides, *p*, parenchyme; *cn*, cellules nécrosées).

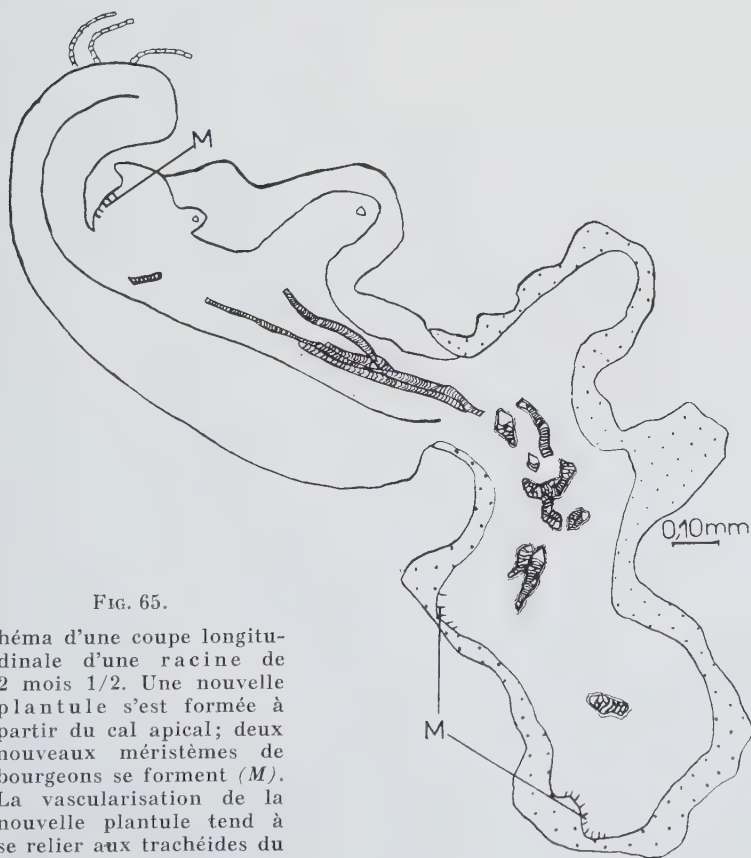


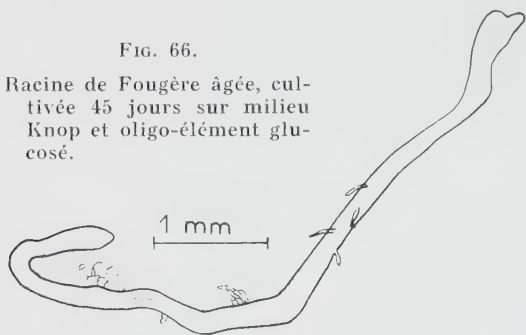
FIG. 65.

Schéma d'une coupe longitudinale d'une racine de 2 mois 1/2. Une nouvelle plantule s'est formée à partir du cal apical; deux nouveaux méristèmes de bourgeons se forment (*M*). La vascularisation de la nouvelle plantule tend à se relier aux trachéides du cal.

ture de tissu, notamment par la formation de bourgeons à l'intérieur d'un parenchyme homogène. La manière dont se développent ces bourgeons, et en particulier l'emplacement et l'orientation de la vascularisation produite, est analogue aux phénomènes observés dans les greffes chez l'endive par CAMUS (1949). Dans ce cas, le méristème de bourgeons en voie de croissance est capable de déterminer, dans les tissus sous-jacents, des processus d'histogénèse et en particulier la différenciation de formations vasculaires.

La formation du cal radiculaire est assurée par les cellules situées immédiatement sous la coiffe, cette dernière ne participe jamais à

FIG. 66.
Racine de Fougère âgée, cultivée 45 jours sur milieu Knop et oligo-élément glucosé.



l'histogénèse. L'apicale et les cellules sous-jacentes cessent de se diviser dans des directions privilégiées comme elles auraient dû normalement le faire : leur division se fait d'une manière anarchique. Tout se passe donc comme si l'architecture de l'organisation radiculaire normale s'était perdue.

Comment expliquer cette prolifération anormale ? Généralement, en effet, les racines isolées en culture s'allongent (ROBBINS et SCHMIDT, 1937, 1939; WHITE, 1938; BONNER et ADDICOTT, 1937; BONNER et DERIVIAN, 1939), sans jamais donner de formes anormales pour peu que le milieu soit convenablement choisi et renouvelé. Des cals sur les racines isolées ont pourtant été observés (NORTON et BALL, 1954) par exemple sur les racines de Légumineuses (RAGGIO, RAGGIO et TORREY, 1957; TORREY et SHIGEMURA, 1957); sur celles d'hybrides de tabacs (SKOOG, 1944; TRYON, 1955) ou encore sur les racines virosées (NICKELL, 1954), etc. Mais, même sur ces racines, il ne s'agit jamais de cals apicaux. Seuls, MAHESHWARI et BALDEV (1961) ont signalé que les embryons très jeunes de *Cuscuta reflexa* cultivés *in vitro* pouvaient donner une masse parenchymateuse au sein de laquelle se différencient plusieurs bourgeons qui donnent de nouveaux embryons. Parfois même, le bourgeonnement peut se faire à partir de cals produits par l'extrémité radiculaire d'embryons plus gros.

Il est d'autant plus frappant de constater la formation de cals apicaux sur *Cuscuta* qu'il est possible de comparer le cal apical des racines de Fougères, par son parenchyme, et ses bourgeons, à une formation curieuse des Orobanches à laquelle VELENOVSKY (1905) a donné le nom de *procaulome*. Cet organisme se produit normalement durant la germination des Orobanches. Les graines d'Orobanches (PRIVAT, 1961) germent, en effet, en donnant un filament dont l'extrémité apicale se renfle en une masse tuberculeuse de cellules isodiamétriques

à noyaux volumineux, sans aucune différenciation histologique. La partie terminale de ce filament se fixe sur la racine hôte, s'accroît régulièrement pour donner un tubercule, à l'intérieur duquel se forme une zone méristématique endogène, dont le développement produira la hampe florale.

Le même type de germination à procaulome se rencontre aussi chez les Rafflésiacées et les Pyrolacées. Chez ces dernières, la germination donne naissance à un corps cylindrique qui vit librement et d'où naissent les axes floraux.

Chez les Balanophoracées (MANGENOT, 1947), le corps végétatif, réduit à une racine, est à l'état de tubercules ou procaulomes, d'où les hampes florales tirent leur origine.

Il est frappant de constater que toutes ces plantes sont parasites ou saprophytes. Or, l'on sait combien la vie hétérotrophe a d'influence sur la structure des végétaux.

Notre racine de Fougère étant cultivée dans des conditions strictement hétérotrophes, doit-on voir là, la cause réelle de ces régénérations curieuses ? Pourtant, il semble que, dans ces phénomènes de régénération, l'isolement radiculaire et par conséquent, la suppression de l'influence du méristème apical de la tige aient aussi leur importance.

Il se pourrait que ce soit ce dernier qui détienne le plan d'organisation de la racine, car si les racines restent attachées à la plante mère, il n'y a pas formation de cal quand on détruit leur apicale. En effet, KADEJ (1960) a pu tuer d'un coup d'aiguille la cellule apicale des racines de *Davallia solida* restée attachée à la plante mère; cet auteur a observé la régénération de deux nouvelles apicales suivies d'une reprise normale de la croissance de la racine.

Quoi qu'il en soit, on est obligé d'admettre qu'il ne peut y avoir une racine normale sans cellule apicale, que la présence de cette dernière soit ou non conditionnée par le méristème apical de la tige. Bien que certains auteurs aient souligné la paresse mitotique de cette cellule (BUVAT et LIARD, 1953; BUVAT, 1955), il semble que sa présence soit indispensable à la formation d'un organe harmonieux, ce qui corrobore l'opinion de CLOWES (1961) « *In plants with single apical cells, this cell is indispensable* ».

On pourrait aussi penser que le méristème de la jeune racine, comme les jeunes primordium foliaires (STEEVES, 1961) de Fougère, n'est pas déterminé irréversiblement, même lorsqu'il a fonctionné pendant un certain temps et, soustrait à l'influence du méristème de la tige de la plantule, ses cellules et sa propre apicale perdraient la possibilité de se diviser dans des directions privilégiées et selon un plan pré-établi pour finir par recouvrer toutes les potentialités de l'œuf.

Finalement, de l'étude comparative de la culture *in vitro* des quatre organes isolés de la jeune plantule, la feuille, la racine, le pied et l'apex, on peut conclure que chacune de ces parties est capable de retrouver les possibilités normales de l'œuf : elles sont susceptibles

de redonner les divers organes de la plantule. Cependant, alors que l'apex de la tige et la première feuille redonnent d'emblée des plantules normales, la racine et le pied passent par un stade de cal transitoire, formé de parenchyme homogène sans différenciation histogène, au sein duquel se forment plusieurs bourgeons sporophytiques.

Ces deux séries d'organes, racine et pied d'une part, feuille et apex de l'autre, qui proviennent des deux pôles opposés de l'œuf n'ont pas les mêmes réactions, comme elles n'avaient pas les mêmes besoins trophiques.

Comme nous l'avons déjà vu (p. 54), cette constatation laisserait supposer qu'une fois la première division de l'œuf réalisée, les cellules épibasale et hypobasale ont chacune des caractères spécifiques qui conditionnent le comportement des cellules qui en dérivent.

E. — LE PIED ET LA RACINE : LEUR VALEUR MORPHOLOGIQUE

De nombreux auteurs, nous l'avons dit précédemment, ont tenté de connaître la valeur morphologique du pied des Fougères. Qu'apportent nos recherches sur ce problème ?

Nous avons pu constater tout d'abord que le pied chez *Pteris longifolia* n'était constitué que de cellules parenchymateuses sans aucune trace de vascularisation. Pourtant, il existe, chez certaines fougères, plus archaïques que l'espèce étudiée, les restes d'une vascularisation.

En effet, chez *Osmunda regalis*, M^{me} B. GRAILLE (1961) a pu mettre en évidence un endoderme bien visible dans le suçoir; elle a interprété cet organe comme une racine arrêtée dans son développement normal et modifiée par la phylogénèse en un suçoir spécialisé.

Nous avons montré, en outre, que le pied et la racine mis en culture se comportaient de la même manière, en ce sens que ces deux organes, avant de régénérer les mêmes bourgeons sporophytiques, passent par une phase transitoire de cal parenchymateux.

Ces résultats expérimentaux permettent de supposer que ces deux organes sont homologues, même s'ils sont séparés par des caractères morphologiques (forme) et histologiques (l'un est uniquement constitué d'un parenchyme, l'autre comporte tous les tissus normaux d'une racine), très différents.

Nous savons par les observations d'EMBERGER (1949) que les caractères généraux attribués aux racines n'ont pas de valeur absolue et que ces organes se distinguent *fondamentalement* des tiges par leur rôle physiologique. Cet auteur précise même que, en conséquence, « tous les organes » qui ont un rôle physiologique de racine pourraient être appelés « racine ».

Or, le suçoir a précisément pour fonction, tout comme la racine, de puiser les substances nutritives dans le milieu extérieur. En conséquence, il semble bien que les faits sont en faveur de l'interprétation d'un pied-racine et non, comme le pense CHAUVEAUD, d'un pied-feuille. Cette racine se serait transformée au cours de la phylogénèse; elle aurait commencé par perdre ses faisceaux vasculaires, puis son endoderme, et se serait ainsi adaptée à sa fonction d'absorption dans un individu-hôte, en l'occurrence le prothalle. C'est parce qu'il vide le prothalle de ses substances nutritives que le pied a cette structure particulière de suçoir. On peut comparer son rôle à celui de l'extrémité du cotylédon qu'on appelle suçoir, chez les Monocotylédones à graines albuminées, l'albumen étant l'analogue du prothalle ?

CHAPITRE III

RÉSULTATS OBTENUS ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons essayé, au cours de nos recherches, de mettre en évidence quelques-uns des facteurs déterminants de la morphogénèse du sporophyte des Fougères. Parmi ces facteurs, nous avons pu discriminer ceux qui proviennent du prothalle de ceux d'autre origine.

Nous avons également recherché la signification morphologique des différents organes de la jeune plantule et la cause profonde de l'organisation de cette dernière.

Pour résoudre ces problèmes, nous nous sommes adressés, plus particulièrement, à une espèce de Polypodiacées, *Pteris longifolia* L., que nous avons cultivée aseptiquement.

Les points qui se dégagent de notre travail sont les suivants :

1° Nous avons pu, tout d'abord, mettre en évidence les facteurs de la morphogénèse du jeune sporophyte porté par un prothalle, puis ceux qui régissent le développement du sporophyte isolé, séparé du prothalle.

Certains facteurs n'agissent que sur le développement de certains organes, ce qui nous avait amenée à conclure à une répartition différentielle des métabolites à l'intérieur du jeune embryon.

2° En comparant les résultats ainsi obtenus, nous avons pu préciser que le rôle du prothalle est essentiellement nutritif et, en comparant nos résultats à ceux d'autres auteurs, nous nous sommes rendus compte que les éléments qu'il fournit à l'embryon sont différents à chacun des stades du développement.

3° Nos expériences sur la régénération du jeune sporophyte nous permettent de dire que chacun de ses quatre premiers organes, racine, feuille, axe et pied, est capable de manifester toutes les potentialités morphogènes de l'œuf et reconstituer une plantule normale.

4° Bien que, finalement, les cultures de chaque organe aboutissent à la formation de plantules, les régénérations ne se font pas de la même manière pour chacun d'eux. L'apex caulinaire et la feuille redonnent d'emblée des plantules, le pied et la racine passent par une phase de cal parenchymateux. Cette identité de réaction entre la racine

et le pied contribue aussi à justifier l'une des hypothèses émises sur la valeur morphologique du pied : il s'agirait plutôt d'un pied-racine (EMBERGER, GRAILLE), que d'un pied-feuille (CHAUVEAUD).

5° Contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, ce n'est pas à la cicatrice de la blessure que se forme le cal parenchymateux radiculaire. Il s'agit, en fait, d'un cal *apical*.

A. — FACTEURS DE LA MORPHOGÉNÈSE DES SPOROPHYTES

— Après avoir précisé la manière dont s'effectue la morphogénèse des jeunes plantules de Fougères dans les conditions naturelles, nos recherches ont porté sur l'étude des conditions à réaliser pour aboutir à un développement identique *in vitro*.

Les conditions optimales de la morphogénèse *in vitro*, du gamétophyte de *Pteris longifolia*, ayant été déjà déterminées (PARÈS, 1958), nous avons porté notre attention sur l'étude du sporophyte issu de ces gamétophytes.

— Nous avons constaté que, pour obtenir des sporophytes normaux porteurs de frondes adultes, il suffit d'utiliser le liquide de Knop additionné de 0,5 cm³ par litre de solution oligo-dynamique de Berthelot et d'exposer les prothalles à la lumière continue. Il n'est besoin ni d'auxine ni de vitamines. L'ensemble sporophyte et prothalle est donc, dans ces conditions, autotrophe.

— Ainsi, l'organogénèse du sporophyte est identique à celle qui se produit dans les conditions naturelles.

— Pour pouvoir déterminer le rôle du gamétophyte au cours de la morphogénèse du sporophyte, nous avons pratiqué la culture d'embryons isolés au stade où les initiales de la première feuille et de la première racine étaient déjà individualisées.

Nous avons cultivé des fragments de gamétophytes, composés d'un seul archégone entouré de quelques cellules prothalliennes seulement. Ces quelques cellules haploïdes n'ont pas d'influence sur la nutrition de l'embryon qu'elles contiennent. D'une part, elles se nécrosent très rapidement; d'autre part, DE MAGGIO et WETMORE (1961) ont constaté un développement analogue, dans des conditions identiques aux nôtres, mais à partir d'embryons entièrement extraits de l'archégone.

— Les conditions optimales du développement des embryons non isolés une fois déterminées, nous avons cru qu'elles mettraient aussi celui des embryons isolés. Or, il n'en est rien; même en lumière continue, le liquide de Knop enrichi de la dose habituelle des oligo-éléments de Berthelot ne permet pas une croissance normale. Seul l'apex de la tige et des feuilles juvéniles se forment; la rhizogénèse ne s'accomplit pas, et il n'y a jamais apparition de feuilles de type adulte.

— Nous avons pu montrer l'absence de division dans la partie qui aurait dû donner la racine; les cellules y ont perdu leurs caractères méristématiques et ont atteint un certain degré de différenciation.

Nous avons donc recherché les conditions d'une rhizogénèse normale chez les embryons isolés. Nous avons pu montrer que le milieu liquide n'empêche pas la formation de la racine et qu'il n'y a pas adaptation des plantules à une vie hydrophytique, comme on l'a parfois pensé, à propos de certaines Fougères dépourvues de première racine (STONE, 1958), mais qu'en réalité la rhizogénèse ne s'effectue pas, parce qu'il manque, dans nos milieux de culture, un ou plusieurs facteurs que l'embryon isolé est incapable de synthétiser lui-même et qui lui sont normalement fournis par le prothalle, lorsque l'embryon se développe dans les conditions naturelles.

Ces premières tentatives, faites avec un milieu simple, n'ayant pu conduire à un succès complet, nous nous sommes adressée aux substances de divisions. Nous avons alors utilisé des auxines, auxines qui, dans les conditions normales, seraient synthétisées à l'apex du prothalle (ALBAUM, 1938). Or, nos expériences ont montré que, quelle que soit la concentration des diverses auxines utilisées, il est impossible d'arriver par ce moyen à un développement complet : à elles seules, ces substances n'ont pas d'action sur la rhizogénèse chez *Pteris*.

— Outre les auxines, nous avons pensé que le prothalle élabore probablement des vitamines. Nous avons utilisé celles que nous savions indispensables soit au développement de racines isolées, soit au développement de certains embryons *in vitro*. Que ce soit la thiamine, la biotine ou le méso-inositol, ou un mélange de ces trois vitamines, aucun de ces produits n'a déclenché la rhizogénèse; tout au plus arrive-t-on à un gonflement de la partie radiculaire; mais jamais une première racine normale ne perce l'enveloppe archégoniale. Outre ce gonflement, les vitamines aboutissent quelquefois à la formation de feuilles aberrantes.

— A la suite de ces résultats négatifs, il nous a semblé logique de supposer qu'un embryon isolé, même avec plusieurs feuilles juvéniles, n'effectuait pas une photosynthèse suffisante pour être complètement autotrophe. On sait en effet que, dans certains cas, l'initiation des primordia radiculaires à la base des boutures ne peut se faire, même en présence d'auxine, parce qu'il manque un facteur qui, ajouté à la solution de trempage contenant l'auxine, induira, sous l'action de cette dernière, la formation de racines visibles.

Nous avons donc additionné notre solution nutritive de 2 % de glucose et placé nos cultures sous l'habituel éclaircissement de douze heures par jour.

Dans ces conditions, outre une rhizogénèse normale, il y a formation de feuilles de type adulte. Le développement des plantules est plus rapide que dans les conditions naturelles.

— Nous avons poursuivi pendant deux ans et demi nos cultures; après ce délai, nous avons obtenu sur quelques-unes des feuilles adultes, le développement de la fausse indusie caractéristique de l'espèce, mais nous n'avons pas observé la formation des sporanges.

— A la suite de cette expérience, nous avons pu mettre en évidence le rôle des glucides dans l'organogénèse et les différences de métabolisme entre les cellules du méristème apical de la tige et celles du méristème radiculaire. Nous avons conclu à une répartition différentielle des métabolites à l'intérieur de la jeune plantule. C'est donc, pensons-nous, un glucide élaboré par le prothalle qui induit la rhizogénèse.

Nous concluons aussi qu'un apport nutritif plus important permet au méristème apical, déjà capable de donner des feuilles juvéniles, de fonctionner pour donner des feuilles plus compliquées. En cela, nos conclusions concordent avec celles de la plupart des auteurs (GOBEL, ALLSOPP, etc.) qui avaient pu montrer que le développement hétéroblastique est déterminé par la nutrition de l'apex.

— Nous avons essayé d'obtenir le développement des embryons isolés en milieu solide glucosé, afin de vérifier si la nature du milieu liquide ne nuisait pas au développement. Comme l'avaient montré plusieurs auteurs, le milieu solide est moins favorable à la formation des premiers organes de l'embryon que le milieu liquide. Par la suite, le retard observé chez les premiers s'estompe, et il n'y a plus de différences entre les uns et les autres.

— Nous avons aussi montré que l'adjonction de vitamines à nos milieux de culture glucosés n'améliore pas sensiblement la morphogénèse après l'apparition des feuilles adultes, nous pensons que la plante est capable de les synthétiser elle-même.

— En comparant les facteurs présidant à la morphogénèse des embryons isolés déjà pourvus de leurs initiales foliaire et radiculaire, et les facteurs influençant la morphogénèse des embryons non isolés portés par leur prothalle, nous avons pu mettre en évidence ceux qui proviennent du prothalle.

Pour avoir une vue aussi complète que possible du rôle du prothalle à tous les stades de l'embryogénèse, nous avons discuté les travaux récents et en particulier ceux de DE MAGGIO et WETMORE (1961), qui ont cultivé des embryons isolés et, en particulier, des embryons encore dépourvus de leurs initiales, ainsi que des zygotes.

L'ensemble des résultats permet de tirer les conclusions suivantes :

— Le rôle du prothalle est essentiellement nutritif, mais il devient de moins en moins important, au fur et à mesure que le sporophyte acquiert son autotrophie. Ce stade n'est atteint qu'au moment où la plantule porte une ou deux feuilles de type adulte.

— Dès le stade zygote, le prothalle commence à assurer la maturation de ce dernier par transfert de matériaux nutritifs élaborés dans ses cellules vers le zygote (WARDLAW, 1955).

A la suite des travaux sur la polarité des Archégoniés, il est vraisemblable que l'établissement de la polarité et le premier clivage du zygote sont du ressort du prothalle. Ces phénomènes seraient induits soit par les parois archégoniales (DE MAGGIO et WETMORE), soit par la direction du gradient de répartition, apex-spore, des matières nutritives et de substances de croissance dans le prothalle (JAYASEKERA et BELL).

— Au cours des premiers stades du développement de l'embryon, le prothalle serait le producteur d'une substance (DE MAGGIO, *loc. cit.*), dont l'action est nécessaire à l'individualisation des initiales de la racine et de la feuille.

— Nos propres expériences montrent clairement qu'une fois les initiales individualisées, le prothalle, par la photosynthèse qu'il effectue, apporte le surcroît de glucide nécessaire pour que la rhizogénèse puisse s'effectuer. Ce surcroît de glucide permet aussi le développement des feuilles de type adulte.

— C'est une fois le stade feuille adulte atteint que le prothalle disparaît.

B. — LA RÉGÉNÉRATION CHEZ LES PLANTULES

Nous avons tenté de cultiver *in vitro* chacun des organes de la jeune plantule. De ces expériences, les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

Le point végétatif des jeunes plantules, isolé en culture, est capable, comme celui des Angiospermes, de redonner une plante entière :

— Cette régénération s'effectue en milieu minéral sucré, sans substances de divisions et sans substances stimulantes.

— La première feuille, outre des formations prothalliennes aposporiques, donne à partir de ses cellules épidermiques, de jeunes plantules. Celles-ci ne sont normales que si le milieu de culture contient un sucre.

— Nous arrivons, par une voie différente, à la même conclusion que celle que nous avons mise en évidence dans le premier chapitre, à savoir que les glucides jouent un rôle dans la rhizogénèse.

— La culture du suçoir des Fougères aboutit à la formation d'un grand nombre de plantules, mais il y a passage, avant leur formation, par une phase de cal parenchymateux.

— Le pied en effet produit, lorsqu'il est libéré des cellules prothalliennes qui l'entourent et des inhibitions des autres organes de la plantule, un cal indifférencié, dont la culture est *très parallèle* à une véritable culture de tissus.

— La culture *in vitro* de la première racine des Fougères aboutit

à la formation d'un cal apical sur lequel peuvent se développer plusieurs plantules.

Lorsque la racine est plus âgée, elle perd cette propriété.

— La culture du cal apical est identique à une culture de tissu.

— Ce cal rappelle aussi le procaulome des Orobanches et de nombreuses plantes parasites et saprophytes.

— A notre avis, la suppression de l'influence apicale, jointe à la culture en milieu hétérotrophe, serait la cause de cette étrange prolifération.

Ceci nous permet de conclure que chez les plantes à une seule cellule apicale, celle-ci est indispensable à un développement normal.

— Enfin, il est logique de supposer que le pied-suçoir des Fougères doit être considéré, du point de vue morphologique, comme une racine modifiée en vue de sa fonction d'absorption dans le prothalle-hôte.

— Nos expériences prouvent enfin que la plantule de Fougère comporte deux séries d'organes différents, le pied et la racine d'une part; la feuille et l'apex de l'autre. Mais, quoi qu'il en soit, chacune de ces parties est capable de retrouver toutes les possibilités morphogènes de l'œuf, pour redonner des plantules normales.

BIBLIOGRAPHIE

- ADDICOTT (F. T.), 1941. — Effect of root growth hormones on the meristem of excised pea roots. *Bot. Gaz.*, **102**, p. 102-576.
- ADDICOTT (F. T.) et DERIVIAN (P. S.), 1939. — A second growth factor for excised pea roots : nicotinic acid. *Amer. Journ. Bot.*, **26**, p. 667-671.
- ALBAUM (G. H.), 1938. — Normal growth, regeneration and adventitious outgrowth formation in Fern prothallia. *Amer. Journ. Bot.*, **25**, p. 37-44.
- ALBAUM (G. H.), 1938. — Inhibitions due to growth hormones in Fern prothallia and sporophytes. *Amer. Journ. Bot.*, **25**, p. 124-133.
- ALLSOPP (A.), 1951. — *Marsilea* sp : materials for the experimental studies of morphogenesis. *Nature*, **168**, p. 301.
- ALLSOPP (A.), 1952. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XVII. The effect of various physiologically actives substances on the development of *Marsilea* in sterile culture. *Ann. Bot.*, N. S., **16**, p. 165-184.
- ALLSOPP (A.), 1953. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XIX. Investigations on *Marsilea*. 2. Induced reversion to juvenile stages. *Ann. Bot.*, N. S., **17**, p. 37-55.
- ALLSOPP (A.), 1953. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XX. Investigations on *Marsilea*. 3. The effect of various sugars on development and morphology. *Ann. Bot.*, N. S., **17**, p. 447-460.
- ALLSOPP (A.), 1954. — A comparison of the effect of 3-indolylacetic acid and 3-indolylacetoneitrile on the development of sporelings of *Marsilea* in aseptic culture. *Journ. Exp. Bot.*, **5**, p. 16-23.
- ALLSOPP (A.), 1954. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XXIV. Investigations on *Marsilea*. 4. Anatomical effects of changes in sugars concentration. *Ann. Bot.*, N. S., **18**, p. 449-461.
- ALLSOPP (A.), 1955. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. XXVII. Investigations on *Marsilea*. 5. Cultural conditions and Morphogenesis with special reference to origin of Land and Water forms. *Ann. Bot.*, N. S., **19**, p. 247-264.
- ALLSOPP (A.), 1956. — Morphogenetic effects of 3-indolylacetoneitrile on sporelings of *Marsilea* in aseptic culture. *Journ. Exp. Bot.*, **7**, p. 1-13.
- ALLSOPP (A.), 1956. — Apical dominance in *Marsilea* with particular reference to the effects of 3-indolylacetic acid, 3-indolylacetoneitrile and coumarin on lateral bud development. *Journ. Exp. Bot.*, **7**, p. 14-23.
- BALL (E.), 1946. — Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. *Amer. Journ. Bot.*, **33**, p. 301-318.
- BALL (E.), 1950. — Experimental dividing of a shoot apex. *Proc. of the 7th. Int. Bot. Congr.*, Stockholm, p. 371-372.
- BALL (E.), 1956. — Growth of the embryo of *Ginkgo biloba* under experimental conditions. I. Origin of the first root of the seedling *in vitro*. *Amer. Journ. Bot.*, **43**, p. 488-495.
- BALL (E.), 1959. — Growth of the embryo of *Ginkgo biloba* under experimental conditions. III. Growth rates of root and shoot upon media absorbed through the cotyledons. *Amer. Journ. Bot.*, **46**, p. 130-139.

- BEYERLEE (R.), 1932. — Untersuchungen über die Regeneration von Farnprimärblättern. *Planta*, **16**, p. 622-665.
- BONNER (J.), 1937. — Vitamin B₁, a growth factor for higher plants. *Science*, **85**, p. 183-184.
- BONNER (J.), 1938. — Thiamine (vit. B₁), and the growth of roots. The relation of chemical structure to physiological activity. *Amer. Journ. Bot.*, **25**, p. 543-547.
- BONNER (J.), 1940. — On the growth factor requirements of isolated roots. *Amer. Journ. Bot.*, **27**, p. 692-701.
- BONNER (J.) et ADDICOTT (F. T.), 1937. — Cultivation *in vitro* of excised pea roots. *Bot. Gaz.*, **99**, p. 144-170.
- BONNER (J.) et DERIVIAN (P. S.), 1939. — Growth factors requirements of four species of isolated roots. *Amer. Journ. Bot.*, **26**, p. 661-665.
- BONNET (A. L. M.), 1955. — Contribution à l'étude des Hydroptéridées : recherches sur *Salvinia auriculata* Aubl. *Ann. Sc. Nat., Bot.*, 11^e série, **16**, p. 529-601.
- BONNET (A. L. M.), 1956. — Contribution à l'étude des Hydroptéridées. 4. Commentaires et conclusions générales. *Nat. Monsp.*, série Bot., **8**, p. 37-104.
- BONNET (A. L. M.), 1957. — Contribution à l'étude des Hydroptéridées. 3. Recherches sur *Azolla filiculoides* Lamk. *Rev. Cyt. et Biol. Veg.*, **8**, p. 1-85.
- BOUILLENNE (R.), 1952. — Nature chimique des substances de croissance et rhizogénèse. *C. R. du III^e Congr. international de Phytopharmacie*, **2**, p. 699-704.
- BOUILLENNE (R.), 1950. — La rhizogénèse. *Coll. Int. du C. N. R. S.*, sur la Morphogénèse, *Ann. Biol.*, **26**, fasc. 10.
- BOWER (F. O.), 1923. — The Ferns. Vol. I : *Analytical examination of the criteria of comparison* (Cambridge University Press, édit.).
- BOWER (F. O.), 1935. — *Primitive Land Plant also known as the Archegoniatae* (Mac Millan and Co., London).
- BRIGGS (W. R.) et STEEVES (T. A.), 1958. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L. The expansion and maturation of vegetative fronds. *Phytomorphology*, **8**, p. 234-248.
- BRIGGS (W. R.) et STEEVES (T. A.), 1959. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L. The mechanism of crozier uncoiling. *Phytomorphology*, **9**, p. 134-147.
- BRIGGS (W. R.), STEEVES (T. A.), SUSSEX (I. M.) et WETMORE (R. H.), 1955. — A comparison of auxin destruction by tissue extracts and intact tissues of the fern *Osmunda cinnamomea* L. *Plant Physiol.*, **30**, p. 148-155.
- BRISTOW (J. M.), 1962. — The controlled *in vitro* differentiation of callus derived from a fern, *Pteris cretica* L., into gametophytic or sporophytic tissues. *Developmental Biology*, **4**, p. 361-375.
- BROWN (C. L.) et GIFFORD (E. I.), 1958. — The relation of the cotyledons to root development of Pine embryos grown *in vitro*. *Plant Physiol.*, **33**, p. 57-64.
- BUVAT (R.) et LIARD (O.), 1953. — Interprétation nouvelle du fonctionnement de l'apex d'*Equisetum arvense*. *C. R. Ac. Sc.*, **237**, 88-90.
- BUVAT (R.), 1955. — Le méristème apical de la tige. *Année Biologique*, **31**, 595-656.
- CAMPBELL (D. H.), 1918. — *The structure and development of mosses and ferns (Archegoniatae)* (Mac Millan and Co, 3rd. edit., London).
- CAMUS (G.), 1949. — Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse. *Rev. Cyt. Biol. Vég.*, **11**, p. 1-195.
- CHADEFAUD (M.) et EMBERGER (L.), 1960. — *Traité de Botanique* (systématique). T. II. Les végétaux vasculaires (Masson et C^{ie}, édit.).
- CHAMPAGNAT (P.), 1961. — Différenciation. Formation des racines et des bourgeons. *Handb der Pflanzenphysiol.*, **14**, p. 839-871.
- CHAUVEAUD (G.), 1906. — Formation de la tige chez les Cryptogames vasculaires. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **53**, p. 208-215.
- CHAUVEAUD (G.), 1911. — L'appareil conducteur des plantes vasculaires et les phases principales de son évolution. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 9^e série, **13**, p. 118-436.
- CHAUVEAUD (G.), 1921. — *La constitution des plantes vasculaires révélée par leur ontogénie*. Payot, édit., Paris.

- CLOWES (F. A. L.), 1961. — *Apical meristems* (Blackwell Scientific Publications Oxford).
- CLUTTER (M. E.) et SUSSEX (I. M.), 1959. — The induction of meiosis in *sporangia* on excised fertile *pinnae* of *Osmunda cinnamomea* *in vitro*. *C. R. IX^e Congrès international Bot.*, **2**, 77.
- CROTTY (W. J.), 1955. — Trends in the pattern of primordial development with age in the fern *Acrostichum danaeifolium*. *Amer. Journ. Bot.*, **42**, p. 627-636.
- CUTTER (E. G.), 1956. — Experimental and analytical studies in Pteridophytes. XXXIII. The experimental induction of buds from leaf primordia in *Dryopteris aristata* Druce. *Ann. Bot., N. S.*, **20**, p. 143-165.
- CUTTER (E. G.), 1957. — Experimental and analytical studies in Pteridophytes. XXXVI. Further experiments on the developmental potentialities of leaf primordia in *Dryopteris aristata* Druce. *Ann. Bot., N. S.*, **21**, p. 343-372.
- DE MAGGIO (A. E.), 1961. — Morphogenetic studies on the fern *Todea Barbara* (L.) Moore. I. Life history. *Phytomorphology*, **11**, p. 46-64.
- DE MAGGIO (A. E.), 1961. — Morphogenetic studies on the fern *Todea barbara* (L.) Moore. II. Development of the embryo. *Phytomorphology*, **11**, p. 64-79.
- DE MAGGIO (A. E.), 1963. — Morphogenetic factors influencing the development of fern embryos. *J. Linn. Soc. (Bot.)*, **58**, p. 361-377.
- DE MAGGIO (A. E.) et WETMORE (R. H.), 1961. — Morphogenetic studies on the fern *Todea barbara*. III. Experimental embryology. *Amer. Journ. Bot.*, **48**, p. 551-565.
- DE MAGGIO (A. E.) et WETMORE (R. H.), 1961. — Growth of fern Embryos in sterile culture. *Nature*, **191**, p. 94-95.
- DIGBY (L.), 1905. — On the cytology of apogamy and apospory. *Proc. Roy. Soc.*, p. 463-468.
- DIGBY (L.), 1919. — On the archesporial and meiotic mitoses of *Osmunda*. *Ann. Bot.*, **33**, p. 135-172.
- DRUERY (C. T.) et BOWER (F. O.), 1884. — Apospory in ferns : singular mode of development in *Athyrium filix femina*. *Journ. Linn. Soc. Bot.*, **21**, p. 354-388.
- EDWARDS (J. P.) et ALLSOPP (A.), 1956. — The effects of changes in the inorganic nitrogen supply on the growth and development of *Marsilea* in aseptic culture. *Journ. Exp. Bot.*, **7**, p. 194-202.
- EMBERGER (L.), 1944. — *Les plantes fossiles dans leurs rapports avec les végétaux vivants* (Éléments de paléobotanique et de morphologie comparée), Masson et C^{ie}, édit., Paris.
- EMBERGER (L.), 1949. — La nature morphologique de la racine. *Rec. Trav. Lab. Bot. Geol. Zool. de l'Univ. de Montpellier, Série Bot.*, **4**, p. 17-21.
- EMBERGER (L.), 1952. — Tige, racine, feuille. *Coll. Int. C. N. R. S. sur l'évolution et la phylogénèse chez les Végétaux*, **41**, p. 108-128.
- EMBERGER (L.), 1960. — Voir CHADEFAUD et EMBERGER.
- GAUTHERET (R. J.), 1959. — *La culture des tissus végétaux* (Techniques et réalisations) (Masson et C^{ie}, édit., Paris., p. 1-863).
- GEBEL (K.), 1905. — *Organography of plants; especially of the Archegoniatae and Spermophyta* (Oxford).
- GEBEL (K.), 1908. — *Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen* B. g. éd., Leipzig, p. 1-260.
- GEBEL (K.), 1915. — *Organographie der Pflanzen*. II. Spezielle Organographie der Archegoniaten (Iéna).
- GOTTLIEB (J. E.) et STEEVES (T. A.), 1961. — Development of the braken fern *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. III. Ontogenetic changes in the shoot apex and in the pattern of differentiation. *Phytomorphology*, **11**, p. 230-242.
- GOTTLIEB (J. E.), 1961. — An experimental study of the shoot system of the braken fern, *Pteridium aquilinum*. *Amer. Journ. Bot.*, **48**, p. 527.
- GRAILLE (B.), 1961. — Contribution à l'étude des Osmondacées. *D. E. S., Bot., Montpellier*, ronéo.
- HANSTEIN (J.), 1865. — Die Befruchtung und Entwicklung der Gattung *Marsilea*. *Jb. für wiss. Bot.*, **4**, p. 197-260.

- HEINRICHER (E.), 1888. — Beeinfluss das Licht die Organanlage am Farnembryo. *Mitt. Bot. Inst. Zu Graz, Jena*.
- HEINRICHER (E.), 1900. — Nachträge zur meiner Studie über die Regenerationsfähigkeit der *Cystopteris*-Arten. *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, **18**.
- HELLER (R.), 1953. — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **14**, p. 1-223.
- HOFMEISTER (W.), 1851. — *Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen* (Leipzig).
- HOFMEISTER (W.), 1857. — *Beiträge zur Kenntnis der Gefässkryptogamen*, **2**, p. 607.
- HOFMEISTER (W.), 1857. — Ueber Entwicklung und Bau der Vegetationsorgane der Farnkräuter. *Abhandl. d. k.-Sächs. Ges. d. Wissensch.*, Leipzig.
- HOLLOWAY (J. E.), 1944. — The gametophyte, embryo, and developing sporophyte of *Cardiomanes reniforme* (Forst.) Presl. *Trans. Roy. Soc., N. S.*, **74**, p. 196-206.
- HUREL-PY (G.), 1941. — Sur la culture aseptique prolongée d'un prothalle de Fougère. *C. R. Acad. Sc.*, **212**, p. 720-722.
- HUREL-PY (G.), 1944. — Sur la germination des spores de *Gymnogramme calamitanos* et sur la culture de ses prothalles en milieu aseptique. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **91**, p. 49-50.
- HUREL-PY (G.), 1947. — De la culture des spores d'*Adiantum cuneatum* et de *Pteris cretica*. *C. R. Acad. Sc.*, **224**, p. 950-952.
- HUREL-PY (G.), 1947. — De l'influence du saccharose sur la croissance du gamétophyte d'*Asplenium* sp. en milieu aseptique. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, p. 356-357.
- HUREL-PY (G.), 1948. — Influence de la lumière sur la culture aseptique des prothalles de Fougères. *C. R. Soc. Biol.*, **142**, p. 297-300.
- HUREL-PY (G.), 1949. — Technique permettant la culture des prothalles de Fougères à partir de la spore. *C. R. Soc. Biol.*, **143**, p. 1500-1501.
- HUREL-PY (G.), 1942. — Etude de quelques milieux permettant la culture illimitée d'un prothalle d'*Asplenium*. *C. R. Acad. Sc.*, **214**, p. 571-573.
- HUREL-PY (G.), 1950. — Recherches préliminaires sur la culture aseptique des prothalles de Filicinées. *Rev. gen. Bot.*, **57**, p. 637-743.
- HUREL-PY (G.), 1955. — Action de quelques sucres sur la croissance des prothalles de Fougères. *C. R. Acad. Sc.*, **240**, p. 1119-1121.
- ITO (M.), 1962. — Studies on the differentiation of Fern gametophyte. I. Regeneration of single cells isolated from cordate gametophytes. *Bot. Mag., Tokyo*, **75**, p. 19-27.
- JAYASEKERA (R. D. E.) et BELL (P. R.), 1959. — The effect of various experimental treatments on the development of the embryo of the fern *Thelypteris palustris*. *Planta*, **54**, p. 1-14.
- KADEJ (F.), 1960. — Regeneration der Scheitelzelle bei Farnwurzeln. *Acta Societ Botan. Polon.*, **29**, p. 363-368.
- KIENITZ-GERLOFF, 1876. — Ueber die genetischen Zusammenhänge der Moose mit den Gefässkryptogamen und Phanerogamen. *Bot. Zeitg.*
- KIENITZ-GERLOFF, 1878. — Untersuchungen über die Entwickl. der Laubmooskapsel und die Embryoentwickl. einiger Polypodiaceen. *Bot. Zeitg.*
- KLEIN (L.), 1884. — Vergleichende Untersuchungen über Organbildung und Wachstum am Vegetationspunkt dorsiventraler Farne. *Bot. Zeitg.*, **37**.
- KNY (L.), 1869. — Entwicklungsgeschichte des Vorkeims der Polypodiaceen und Schizaeaceen. Report in *Bot. Zeit.*, **27**, p. 46.
- KNY (L.), 1872. — Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Farnkräuter. I. Entwicklung des Vorkeimes von *Osmunda regalis*. *Jahrb. wiss. Bot.*, **8**, p. 1-14.
- KNY (L.), 1874. — Keimungs und Entwicklungsgeschichte von *Ceratopteris*. *Nova acta d. R. Acad.*, **37**, p. 385.
- LACHMANN (P.), 1899. — Contribution à l'histoire naturelle de la racine des Fougères. *Ann. Soc. Bot. Lyon.*, p. 1-189.
- LANG (W. H.), 1909. — A theory of alternation of generations in archegoniate plants based upon the ontogeny. *New. Phyt.*, **8**.

- LANG (W. H.), 1915. — Presidential address : phyletic and causal morphology. *Rept. British Assoc. adv. Sci.*, Manchester, p. 701-718.
- LARUE (C. D.), 1936. — The growth of the plant embryos in culture. *Bull. Torrey Club.*, **63**, p. 365-382.
- LAWTON (E.), 1932. — Regeneration and induced polyploidy in Ferns. *Amer. Journ. Bot.*, **19**, p. 303-337.
- LAWTON (E.), 1936. — Regeneration and induced polyploidy in *Osmunda regalis* and *Cystopteris fragilis*. *Amer. Journ. Bot.*, **23**, p. 107-114.
- LEITGEB (H.), 1878. — Zur Embryologie der Farne. *Sitzungsber. d. K. K. Akad. d. Wiss.*, Wien, **77**.
- LEITGEB (H.), 1879. — Studien über Entwicklung der Farne. *Sitzungsber. d. K. K. Akad. d. Wiss.*, Wien, **80**, math.-naturwiss. Kl.
- LIGNIER (O.), 1911. — Essai sur l'évolution morphologique du règne végétal (*C. R. Congrès de Clermont-Ferrand de l'Assoc. Franç.*). *Bull. Soc. Linn. Norm.*, p. 35-62.
- MAC VEIGH (I.), 1937. — Vegetative reproduction of the fern sporophyte. *Bot. Rev.*, **3**, p. 457.
- LÜCK (H. B.), 1962. — Sur l'histogénèse et la différenciation cellulaire. *Ann. Sc. Nat.*, 12^e s., **3**, p. 1-23.
- MAHESHWARI (P.) et BALDEV (B.), 1961. — Artificial production of buds from the embryos of *Cuscuta reflexa*. *Nature, G. B.*, **4784**, p. 191-197.
- MAHESHWARI (N.) et BALDEV (M.), 1961. — Ovaries of *Iberis amara* L. *Phytomorphology*, **11**, p. 17-23.
- MANGENOT (G.), 1947. — Recherches sur l'organisation d'une Balanophoracée : *Thonningia coccinea* Vahl. *Rev. Gén. Bot.*, **54**, p. 201-244, 271-293.
- MANTON (I.), 1932. — Contribution to the cytology of apospory in Ferns. I : a case of induced apospory in *Osmunda regalis*. *Journ. Gen.*, **25**, p. 423-430.
- MOREL (G.), 1950. — Sur la culture des tissus de deux Monocotylédones. *C. R. Acad. Sc.*, **230**, p. 1099-1101.
- MOREL (G.), 1950. — Sur la culture des tissus d'*Osmunda cinnamomea*. *C. R. Acad. Sc.*, **230**, p. 2318-2320.
- MOREL (G.), 1956. — Nouvelles méthodes permettant de réaliser des cultures de tissus végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, **63**, p. 314-325.
- MOREL (G.), 1956. — Prolifération des feuilles d'*Adiantum pedatum* cultivées *in vitro*. *Rev. Gén. Bot.*, **63**, p. 325-331.
- MOREL (G.) et WETMORE (R. H.), 1951. — Fern callus tissue culture. *Amer. Journ. Bot.*, **38**, p. 141-143.
- NAGAI (I.), 1914. — Physiologische Untersuchungen über Farnprothallien. *Flora, N. F.*, **6**, p. 281-330.
- NICKELL (L. G.), 1955. — Nutrition of pathological tissues caused by plant viruses. *Ann. Biol.*, **31**, p. 107-119.
- NITSCH (J. P.), 1951. — Growth and development *in vitro* of excised ovaries. *Amer. Journ. Bot.*, **38**, p. 566-577.
- NORTON (J. P.) et BALL (W. J.), 1954. — Callus and shoot formation from tomato roots *in vitro*. *Sciences*, **119**, p. 220-221.
- PARÈS (Y.), 1958. — Etude expérimentale de la morphogénèse du gamétophyte de quelques Filicinées. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **11**, p. 1-120.
- PARIS (D.), 1955. — Action de quelques vitamines hydrosolubles sur les cultures de tissu végétaux. *I^{er} Colloque Int. sur la Physiol. des cultures de tissus végétaux*. *Ann. Biol.*, **31**, p. 15-29.
- PITOT (A.), 1944. — Contribution à l'étude anatomique de l'appareil radiculaire des Lycopodes. *Rec. Trav. Inst. Bot. Montpellier*, **1**, p. 41-55.
- PRINGSHEIM, 1863. — Zur Morphologie der *Salvinia natans*. *Jahrb. für Wiss. Bot.*, **111**.
- PRIVAT (G.), 1960. — Recherches sur les phanérogames parasites (Etude d'« *Orobanche Hederae* Duby »). *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 12^e série, p. 723-864.
- RAGGIO (M.), RAGGIO (N.) et TORREY (J. G.), 1957. — The nodulation of isolated Leguminous roots. *Amer. Journ. Bot.*, **44**, p. 325-333.

- RANDOLPH (L. F.) et KHAN (R.), 1960. — Growth response of excised mature embryos of iris and wheat to different culture media. *Phytomorphology*, **10**, p. 43-49.
- RAPPAPORT (J.), 1954. — *In vitro* culture of plant embryos and factors controlling their growth. *Bot. Rev.*, **20**, p. 201-225.
- RIETSEMA (J.), SATINA (S.) et BLAKESLEE (A. F.), 1953. — The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. *Amer. Journ. Bot.*, **40**, p. 538-545.
- RIJVEN (A. H.), 1952. — *In vitro* studies on the embryo of *Capsella bursa pastoris*. *Acta Bot. Neerl.*, **2**, p. 157-200.
- RIVIÈRES (R.), 1959. — Sur la culture *in vitro* d'embryons isolés de Polypodiacées. *C. R. Acad. Sc.*, **248**, p. 1004-1007.
- ROBBINS (W. J.), 1939. — Thiamin and plant growth. *Science*, **89**, p. 303-307.
- ROBBINS (W. J.) et SCHMIDT (M. A.), 1937. — Vitamin B1 and the growth of excised tomato roots. *Sciences*, **85**, p. 246-247.
- ROBBINS (W. J.) et SCHMIDT (M.), 1939. — Further experiments on excised tomato roots. *Amer. Journ. Bot.*, **26**, p. 149-159.
- SACHER (J. A.), 1956. — Observations on pine embryos grown *in vitro*. *Bot. Gaz.*, **117**, p. 206-214.
- SADEBECK (R.), 1879. — *Handbuch der Botanik* (Schenk, I, p. 231).
- SCHWABE (W. W.), 1951. — Physiological studies in plant nutrition. XVI. The mineral nutrition of Bracken. Part I: Prothallial culture and the effects of phosphorous and potassium supply on leaf production in the sporophyte. *Ann. Bot., N. S.*, **15**, p. 417-446.
- SCHWABE (W. W.), 1953. — Physiological studies in plant nutrition. XVI. The mineral nutrition of bracken. Part II: the effect of phosphorous and potassium supply on total dry weights, leaf areas, net assimilation rates, starch and water contents, etc., in the sporophyte. *Ann. Bot., N. S.*, **17**, p. 225-262.
- SHANTZ (E. M.), POLLARD (J. K.) et STEWARD (F. C.), 1958. — The growth Promoting Activity of coconut Milk: Synergism between the amphoteric and non-ionic Components. *Plant Physiol.*, **33**, p. 16.
- SKOOG (F.), 1944. — Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer. Journ. Bot.*, **31**, p. 19-24.
- SOSSOUNTZOV (L.), 1958. — Effet de l'indolacetonitrile sur le sporophyte de *Marsilea drummondii* A. Br. (Filicinées, Marsiléacées) cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, p. 815-818.
- SOSSOUNTZOV (L.), 1958. — Morphologie du sporophyte de *Marsilea drummondii* cultivé *in vitro* sur milieu dépourvu de Calcium. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, p. 1257-1260.
- SOSSOUNTZOV (L.), 1958. — Action d'une forte concentration de Mg dans un milieu permettant la croissance normale de *Marsilea drummondii*. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, p. 1726-1728.
- STEEVES (T. A.), 1959. — The development of leaves in sterile nutrient culture. IX^e Congrès, **2**, p. 380.
- STEEVES (T. A.), 1961. — A study of the developmental potentialities of excised leaf primordia. *Phytomorphology*, **11**, p. 346-358.
- STEEVES (T. A.) et BRIGGS (W. R.), 1958. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea*. The origin and early development of vegetative fronds. *Phytomorphology*, **8**, p. 60-72.
- STEEVES (T. A.) et BRIGGS (W. R.), 1960. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L. The auxin relationships of expanding fronds. *Journ. Exp. Bot.*, **31**, p. 45-67.
- STEEVES (T. A.), GABRIEL (H. P.) et STEEVES (M. W.), 1957. — Growth in sterile culture of excised leaves of flowering plants. *Science*, **126**, p. 350-351.
- STEEVES (T. A.) et SUSSEX (I. M.), 1952. — *In vitro* cultures of a fern callus. *Nature*, **170**, p. 672-673.

- STEEVES (T. A.) et SUSSEX (I. M.), 1957. — Studies on the development of excised leaves in sterile culture. *Amer. Journ. Bot.*, **44**, p. 665-673.
- STEEVES (T. A.) et WETMORE (R. H.), 1953. — Morphogenetic studies on *Osmunda cinnamomea* L.: some aspects of the general morphology. *Phytomorphology*, **3**, p. 339-354.
- STEWART (F. C.) et SHANTZ (E. M.), 1959. — The chemical regulation of growth (some substances and extracts which induce growth and morphogenesis). *Amer. Rev. Plant Physiol.*, **10**, p. 379-404.
- STEWART (F. C.), WETMORE (R. H.) et POLLARD (J. K.), 1955. — The nitrogenous components of the shoot apex of *Adiantum pedatum*. *Amer. Journ. Bot.*, **42**, p. 946-948.
- STONE (I. G.), 1958. — Gametophyte and embryo of *Polyphelebium venosum* (R. Br.) Copeland (Hymenophyllaceæ). *Aust. Journ. Bot.*, **6**, p. 183-203.
- SUMINSKI (L.), 1848. — *Zur Entwicklungsgeschichte der Farnkräuter* (Berlin).
- SUSSEX (I. M.), 1958. — A morphological and experimental study of leaf development in *Leptopteris Hymenophyllodes* (A. Rich.) Presle. *Phytomorphology*, **8**, p. 96-107.
- SUSSEX (I. M.) et CLUTTER (M. E.), 1960. — A study of the effect of externally supplied sucrose on the morphology of excised fern leaves *in vitro*. *Phytomorphology*, **10**, p. 87-99.
- SUSSEX (I. M.), CLUTTER (M. E.) et STEEVES (T. A.), 1957. — Factors controlling the fertility of fern leaves in sterile culture (*Abstract of Paper presented before the general section of the Botanical Society of America. A. I. B. S. meetings, Stanford*).
- SUSSEX (I. M.) et STEEVES (T. A.), 1953. — Growth of excised leaves in sterile culture. *Nature*, **172**, p. 624.
- SUSSEX (I. M.) et STEEVES (T. A.), 1958. — Experiments on the control of fertility of fern leaves in sterile culture. *Bot. Gaz.*, **119**, p. 203-208.
- THIMANN (K. V.) et WENT (F. W.), 1934. — On the chemical nature of the root-forming hormone. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, **37**, p. 456-459.
- THOMPSON (J.), 1915. — The anatomy and affinity of *Deparia Hoorei*. *Hook. Trans. Roy. Soc. Edin.*, **50**.
- TORREY (J. G.), 1957. — Auxin control of vascular pattern formation in regenerating pea root meristems grown *in vitro*. *Amer. Journ. Bot.*, **44**, p. 859-870.
- TORREY (J. G.) et SHIGEMURA (Y.), 1957. — Growth and controlled morphogenesis in pea root callus tissue growth in liquid media. *Amer. Journ. Bot.*, **44**, p. 334-344.
- TREUB (M.), 1889. — Etude sur les Lycopodiacees. *Ann. Jard. Bot.*, **8**, p. 1-37.
- TROLL (W.), 1950. — Zur klärung der Polaritätsverhältnisse des Pteridophyten-embryos. *Abh. Akad. Wiss. u. d. Lit., Mainz, math-naturwiss. Kl.*, n° 10.
- TRYON (K.), 1955. — Root tumors on *Nicotiana affinis* seedlings grown *in vitro* on a malt and yeast extract medium. *Amer. Journ. Bot.*, **42**, p. 604-610.
- TUKEY (H. B.), 1934. — Artificial culture methods for isolated embryos of deciduous fruits. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **32**, p. 313-322.
- TUKEY (H. B.), 1938. — Growth patterns of plants developed from immature embryos in artificial culture. *Bot. Gaz.*, **89**, p. 630.
- VAN OVERBEEK (J.), CONKLIN (M. E.) et BLAKESLEE (A. F.), 1942. — Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. *Amer. Journ. Bot.*, **29**, p. 472-477.
- VAN OVERBEEK (J.), CONKLIN (M. E.) et BLAKESLEE (A. F.), 1941. — Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, **94**, p. 350.
- VELENOVSKY (J.), 1905-1913. — *Vergleichende Morphologie der Pflanzen*, Prague.
- VERDOORN (Fr.), 1938. — *Manual of Pteridology* (M. Nishoff. ed. The Hague).
- VLADESCO (A.), 1933. — Sur le développement des octants dans l'embryon des Fougères leptosporangiées. *C. R. Acad. Sc.*, **196**, p. 1241.
- VLADESCO (A.), 1934. — Recherches morphologiques et expérimentales sur l'embryogénie et l'organogénie des Fougères leptosporangiées. *Thèse, Paris*.

- VOUK, 1877. — Die Entwicklung des Embryos von *Asplenium Shepherdii*. *Sitzungsber. d. K. K. Akad. d. Wiss., Wien, math-Naturwiss. Kl.*, **76**.
- WARD (M.), 1954. — Fertilisation in *Phlebodium aureum* J. Sm. *Phytomorphology*, **4**, p. 1 (17).
- WARD (M.), 1954. — The development of embryo of *Phlebodium aureum* J. Sm. *Phytomorphology*, **4**, p. 18-26.
- WARD (M.) et WETMORE (R. H.), 1954. — Experimental control of development in the embryo of the fern *Phlebodium aureum*. *Amer. Journ. Bot.*, **41**, p. 428-434.
- WARDLAW (C. W.), 1943. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. I. Preliminary observations on the development of buds on the rhizome of the ostrich fern *Matteuccia struthiopteris* Tod. *Ann. Bot., N. S.*, **7**, p. 171.
- WARDLAW (C. W.), 1943. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. 2. Experimental observations on the development of buds in *Onoclea sensibilis* and species of *Dryopteris*. *Ann. Bot., N. S.*, **7**, p. 357.
- WARDLAW (C. W.), 1946. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. 7. Stelar morphology : the effect of defoliation on the stèle of *Osmunda* and *Todea*. *Ann. Bot., N. S.*, **9**, p. 97.
- WARDLAW (C. W.), 1946. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes. 8. Further observations on bud development in *Matteuccia struthiopteris*, *Onoclea sensibilis* and species of *Dryopteris*. *Ann. Bot. N. S.*, **9**, p. 117.
- WARDLAW (C. W.), 1947. — Experimental investigations of the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce. *Phil. Trans. Roy. Soc., London*, **232**, p. 343-384.
- WARDLAW (C. W.), 1949. — Further experimental investigations of the shoot apex of *Dryopteris aristata* Druce. *Phil. Trans. Roy. Soc., London*, **233**, p. 415-445.
- WARDLAW (C. W.), 1949. — Experimental on organogenesis in Ferns growth. *Supply*, **13**, p. 93-131.
- WARDLAW (C. W.), 1951. — Organisation in plants. *Phytomorphology*, **5**, p. 22-29.
- WARDLAW (C. W.), 1952. — *Morphogenesis in plants* (London Methuen and Co, New-York J. Wiley and Sons Inc.).
- WARDLAW (C. W.), 1952. — *Phylogeny and morphogenesis. Contemporary aspects of botanical Science* (Macmillan and Co., London).
- WARDLAW (C. W.), 1952. — Experimental and analytical studies in Pteridophytes. 18. The nutritional Status of the Apex and Morphogenesis. *Ann. Bot.*, **16**, p. 207-218.
- WARDLAW (C. W.), 1954. — Experimental and Analytical Studies of Pteridophytes. 26. *Ophioglossum vulgatum* : comparative morphogenesis in embryos and induced buds. *Ann. Bot.*, **18**, p. 397-406.
- WARDLAW (C. W.), 1955. — *Embryogenesis in plants* (Methuen et Co. LTD, London).
- WARDLAW (C. W.), 1959. — Reflexions on the unity of the embryonic tissues in Ferns. *Phytomorphology*, **8**, p. 323-327.
- WARDLAW (C. W.) et CUTTER (E. G.), 1954. — Effect of deep and shallow incisions on organogenesis at fern apex. *Nature*, **174**, p. 734-735.
- WENT (F. W.), 1939. — The dual effect of auxin on root formation. *Amer. Journ. Bot.*, **26**, p. 24-29.
- WETMORE (R. H.), 1953. — Carbohydrate supply and leaf development in sporeling ferns. *Abstract. Science*, **118**, p. 578.
- WETMORE (R. H.), 1949. — Polyphenol-oxydase as a problem in organ culture and auxin diffusion studies of horsetails and Ferns. *Amer. Journ. Bot.*, **36**, p. 830.
- WETMORE (R. H.) et MOREL (G.), 1949. — Growth and development of *Adiantum pedatum* L. on nutrient agar. *Amer. Journ. Bot.*, **36**, p. 805-806.
- WETMORE (R. H.) et WARDLAW (C. W.), 1951. — Experimental morphogenesis in vascular plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **2**, p. 269-292.
- WHITE (P. R.), 1932. — Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. *Plant Physiol.*, **7**, p. 613.

- WHITE (P. R.), 1938. — Cultivation of excised roots of dicotyledonous plants. *Amer. Journ. Bot.*, **25**, p. 348-356.
- WHITE (P. R.), 1940. — Vitamin B6, nicotinic acid, pyridine, glycine and thiamine in the nutrition of excised tomato roots. *Amer. Journ. Bot.*, **27**, p. 811.
- WHITE (P. R.), 1939. — Controlled differentiation in plant tissue culture. *Bull. Torrey Bot. Club.*, **66**, p. 507-513.
- ZIEBUR (N. K.) et BRINK (R. A.), 1951. — The stimulative effect of *Hordeum* endosperm on the growth of immature plant embryos *in vitro*. *Amer. Journ. Bot.*, **38**, p. 390-396.
- ZIMMERMANN (W.), 1938. — Phylogenie in Verdoorn, *Manual of Pteridology*, p. 558-618. Martinus Nijhoff, édit., La Haye.
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

L'ENDÉMISME

VU ET APPROUVÉ :

Montpellier, le 16 décembre 1963.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

B. CHARLES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 17 décembre 1963.

Le Recteur de l'Académie de Montpellier,

G. RICHARD.

Soulisse et Cassegrain, Imp., Niort. Dépôt légal : 3^e trim. 1964. N^o d'ordre : 653.
Masson et C^{ie}, Edit., Paris. Dépôt légal : 3^e trim. 1964. N^o d'ordre : 4130.

(Printed in France.)